



普通高等教育“十二五”规划教材
微生物学实验教程系列

微生物遗传学 实验教程

王磊 陈芝 主编 文莹 主审

MICROBIAL GENETICS
EXPERIMENTATION



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材
微生物学实验教程系列

微生物遗传学实验教程

王 磊 陈 芝 主 编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书分为4章,共25个实验,涉及微生物遗传学基本操作技术;微生物正向遗传学研究常用的方法;微生物基因功能研究技术;基因表达和调控研究技术等4个主要部分。实验操作对象既有革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌(芽胞杆菌、放线菌),又有真菌(丝状真菌、酵母菌)和古菌。实验技术包括了基因突变,化学、物理和生物因子对菌株进行随机诱变等遗传育种方法,也有目的基因克隆、基因敲除、功能互补和目标蛋白功能性氨基酸位点分析等技术。此外,还介绍了目前常用的基因表达与调控研究方法,有基因表达分析、细菌单杂交、凝胶阻滞、Footprinting寻找调控蛋白与DNA结合序列等方法。全书力求涵盖微生物遗传学研究常用的技术和手段。

本书可作为理学、工学、农学、医学及师范类院校生物学专业本科生和研究生教材,也可作为微生物学及相关领域研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

微生物遗传学实验教程 / 王磊, 陈芝主编. —北京: 科学出版社, 2014.6
微生物学实验教程系列

ISBN 978-7-03-040847-1

I. ①微… II. ①王… ②陈… III. ①微生物遗传学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q933-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第116746号

责任编辑: 刘 畅 / 责任校对: 朱光兰
责任印制: 阎 磊 / 封面设计: 迷底书装

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

http: //www.sciencep.com

北京市文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年6月第 一 版 开本: 720×1000 B5

2014年6月第一次印刷 印张: 11

字数: 225 000

定价: 25.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

微生物学实验教程系列编委会

主 委 员	任	李季伦	中国农业大学
	员	李季伦	中国农业大学
		陈文新	中国农业大学
		邢来君	南开大学
		陈冠军	山东大学
		赵良启	山西大学
		顾桂芬	中国农业大学
		楼慧强	中国农业大学
		何 群	中国农业大学
		李 颖	中国农业大学
		李大伟	中国农业大学
		王贺祥	中国农业大学
		封文海	中国农业大学
		宋 渊	中国农业大学
		袁红莉	中国农业大学
		文 莹	中国农业大学

本书编委会名单

主 编 王 磊 (中国农业大学)
陈 芝 (中国农业大学)
副 主 编 张 宁 (沈阳农业大学)

编 者 (按作者姓氏拼音排序)
陈 芝 (中国农业大学)
林榕姗 (山东农业大学)
刘灵芝 (沈阳农业大学)
楼慧强 (中国农业大学)
卢伟东 (青岛农业大学)
陶 丽 (中国科学院微生物研究所)
王 磊 (中国农业大学)
张 宁 (沈阳农业大学)
主 审 文 莹 (中国农业大学)

总 序

中国农业大学生物学院微生物学科创建于 1958 年，由原北京农业大学植保系和土化系的微生物学教研组合并组建而成，是我国高等院校第一个农业微生物学专业。1981 年被国务院学位委员会列为第一批博士点，1993 年被评为农业部重点学科，2001 年被评为国家级重点学科。

本学科特色是研究、挖掘和利用丰富的微生物资源，为农业生产服务。研究方向包括根瘤菌资源调查和系统发育学、固氮酶的生化机制及遗传调控、真菌生理及遗传学、药用及食用真菌学、微生物发酵工程、土壤和环境微生物学，并在此基础上，加强了微生物分子遗传，增加了病毒学、免疫学和生物质能源等研究方向。1985 年，原在植保系的微生物专业参与了中国农业大学生物学院的组建，建立了微生物系，于 2003 年更名为“微生物及免疫学系”。目前本系开设的本科生课程包括：微生物生物学，原核生物进化与系统分类学，真菌生物学，微生物生理学，微生物遗传学，微生物发酵工程，食用菌学，资源与环境微生物学，病毒学及免疫学，每门课程均有理论课和实验课。

本系俞大绂教授等老一代学者及多位已经退休的老师们在微生物学教学思想、课程设置及团队建设等方面，为学科发展做出了巨大的贡献，也为后人的工作奠定了良好的基础。在教学中突出的特色是理论课程与实验课程的紧密结合，特别是对于本专业入门的实验课程，积极推进将“死标本”的观察转变为学生自行分离和观察活体标本，使学生们从被动地接受知识转变为主动地参与学习，有利于促进学生们掌握实验技能，并锻炼思考和分析能力。这种教学理念和模式一直沿用至今。目前本系担任教学工作的是一支中、青年教师结合的队伍，他们责任心强、思想活跃、虚心进取，不断进行教学改革，积极探讨在新的形势下，如何正确解决，“基础与创新”、“理论与实践”、“教学与科研”的关系，认真履行着教师的职责。

本套实验教程的基本资料均来自教师们多年的积累。本系历来坚持教学与科研并重的原则，在多年的发展过程中，逐步规划将教师的科研方向与所承担的课程内容紧密相关，保证教学内容中基础知识与前沿知识相结合，很多实验设计出自任课教师的科研积累。大家齐心协力，勇于创新，不断更新实验教学内容，使各门实验课程的教学工作一直受到学生的好评。

本系承担的 9 门本科生微生物学实验课程一直没有编写正式出版的教材。最近，

在大家的努力和领导的支持下，各位主编在近年完成实验课教学大纲修订的前提下，汇集了来自其他兄弟院校教师们的智慧，终于完成 9 本实验教程的编写，这是大家共同努力的结果。

衷心感谢南开大学邢来君教授、山东大学陈冠军教授、山西大学赵良启教授欣然接受我们的邀请，不仅为本套教材的审稿付出辛勤劳动，同时作为本套实验教程编委会成员，为保证教材的质量献计献策。感谢中国农业大学生物学院领导的支持和“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助，感谢来自兄弟院校全体参编教师们的认真合作。感谢科学出版社为编辑和出版本套教材所付出的努力。希望这套实验教程的出版，为本学科和相关学科读者的学习和工作带来有益的参考，也希望广大读者提出批评和建议，以便我们今后做出修改。



2014 年 1 月

前 言

微生物遗传学是微生物专业的主干课程之一，如何将传统微生物遗传学的经典技术与现代微生物遗传学实验技术相结合，使学生既夯实基础，又掌握前沿技术，始终是我们教学改革过程中关注的问题。本实验教程是以我们在不断学习和教学实践中积累的材料汇编而成。

本实验教程分别以细菌、放线菌、丝状真菌、酵母菌和古菌为实验材料，涵盖微生物基因重组、基因突变、基因功能分析和表达调控等实验技术。在实验内容设计上涉及不同类型实验材料和操作技术，并且力求加深学生对理论知识的理解，掌握这些理论在科研实践中的应用。部分实验内容来源于科研实验，并经过几年教学实验的验证，以保证其稳定性。本书不仅适用于本科生和研究生教学，也适合相关学科的科研人员参考。

本实验教程由工作在教学、科研一线的教师编写，他们具有多年的教学实践经验。山东农业大学林榕姗编写了本书的实验一和实验十一；中国农业大学王磊编写了实验二、三、五、六、十三、十四和十六，陈芝编写了实验四、九、十二、二十二、二十三、二十四和二十五，楼慧强编写了实验七和实验十八；沈阳农业大学刘灵芝编写了实验八和实验十，张宁编写了实验十九、二十和二十一；青岛农业大学卢伟东编写了实验十五和附录；中国科学院微生物研究所陶丽编写了实验十七。全书由王磊、陈芝统稿。

感谢中国农业大学生物学院“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助；感谢科学出版社对本书给予的支持与帮助。洪媛媛博士为芽胞杆菌和真菌转化实验提供了帮助，中国农业大学博士生邹友龙和李晓丽在酵母菌遗传转化、基因突变实验编写中给予了协助，在此一并致以衷心的感谢。

虽然我们试图根据教学现状尽力规划并撰写本实验教程，但书中难免有不足之处，期待读者给予批评和建议，以便及时修订，不断完善。让我们共同为高校本科生和研究生微生物遗传学实验技术的学习和实验技能的提高做出应有的贡献。

编 者

2014年5月于北京

目 录

总序

前言

第一章 微生物遗传学基本操作技术	1
实验一 CaCl_2 法制备大肠杆菌感受态细胞及质粒转化	1
实验二 一步法制备和转化大肠杆菌感受态细胞	4
实验三 蜡状芽胞杆菌的电转化	9
实验四 聚乙二醇介导的链霉菌原生质体转化	12
实验五 丝状真菌土曲霉的原生质体制备及转化	18
实验六 产甲烷古菌脂质体转化	23
实验七 酿酒酵母高效转化: PEG/乙酸锂法	29
实验八 大肠杆菌-根瘤菌的接合转移	33
实验九 大肠杆菌-链霉菌的接合转移	38
实验十 细菌的局限性转导	43
第二章 微生物基因突变技术	49
实验十一 细菌的紫外线诱变及营养缺陷型突变株的筛选与鉴定	49
实验十二 亚硝基胍诱变筛选抗生素过量表达突变株	57
实验十三 转座子引起的插入突变及盐敏感缺陷株的筛选	62
第三章 微生物基因功能的研究	70
实验十四 基于宏基因组文库的功能基因筛选	70
实验十五 设计简并引物克隆目的基因	76
实验十六 根瘤菌的基因敲除及其功能鉴定	84
实验十七 融合 PCR 技术在丝状真菌基因功能研究中的应用	91
实验十八 质粒置换法分析酵母的必需基因功能	100
实验十九 异源回补研究高等真核生物同源基因的功能	106
实验二十 定点突变技术确定目标蛋白的功能性氨基酸位点	113
第四章 微生物基因的表达与调控研究技术	122
实验二十一 实时荧光定量 PCR 法检测功能基因的表达差异	122

实验二十二	利用报告基因检测链霉菌基因的表达	134
实验二十三	利用细菌单杂交系统研究转录因子与靶基因的互作	139
实验二十四	转录调控因子的凝胶阻滞分析	146
实验二十五	DNase I 足迹分析确定转录调控因子的 DNA 结合序列	153
附录 1		157
附录 2		160
附录 3		162

上便可获得所需的转化子。

三、实验材料

1. 菌种和质粒

菌种 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α : *endA1 hsdR17 [r⁻m⁺] supE44 thi-1 recA1 gyrA[NalR] relA1 Δ [lacZYA-argF] U169 deoR [Φ 80 Δ lacZ M15]*

质粒 pUC19: 克隆载体, Amp^r

2. 培养基

LB 培养基 (1 L):

胰蛋白胨 10 g

酵母粉 5 g

NaCl 10 g

pH 6.8~7.0, 121℃ 灭菌 30 min。

3. 抗生素

培养转化子的氨苄青霉素 (Amp) 终浓度为 50 μ g/mL, 用水配制 50 mg/mL 的贮备液, -20℃ 保存。

4. 溶液或试剂

CaCl₂ (0.1 mol/L)。

四、实验步骤

(一) 纯化及活化菌种

1) 将受体菌株大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 划线接种于 LB 琼脂平板中, 置 37℃ 培养 16~20 h。

2) 挑取一单菌落接种到 20 mL 的 LB 培养液中 (20 mL/250mL 三角瓶), 37℃ 振荡培养 2~3 h, 当其 OD₆₀₀ 为 0.4~0.5 时 (细胞数 < 10⁸ 个/mL), 即细胞生长的对数期, 立即取出冰浴 10~15 min。

(二) 制备感受态细胞

1) 将冰浴后培养液转移到 2 个 10 mL 预冷的离心管中, 4℃ 5000 r/min 离心 10 min。

2) 弃上清 (注意: 可用加样器将残留液体尽量除去), 每管各加 5 mL 的 0.1 mol/L 冰预冷的 CaCl₂ 溶液悬浮细胞, 置冰浴中 20 min。

3) 于 4℃ 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清 (注意: 可用加样器将残留液体尽量除去), 回收菌体。分别向每管加入 1 mL 的 0.1 mol/L 冰预冷 CaCl₂ 溶液, 重悬细胞, 放置于冰上, 即制备成感受态细胞悬液。

4) 将此细胞悬液按每份 200 μL 分装于无菌离心管中, 如果不马上使用可加入终浓度为 10% 的无菌甘油, 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱长期保存。

注意: ①实验所用的溶液最好用 3 次蒸馏的水配制, 尽量在冰上操作; ②冰浴为冰水混合物的效果较佳; ③新制备的感受态细胞如果在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 12~24 h, 其转化率可增高 4~6 倍, 但 24 h 后, 转化率将下降; ④以上均要求严格无菌操作。

(三) 转化感受态细胞

1) 取 10 μL 的 pUC19 质粒 DNA 加入到以上制备的 200 μL 感受态细胞中 (不超过 10 μL 的体积, 其中 DNA 小于 50 ng)。

2) 将以上每管样品轻轻混匀, 置冰浴 30 min, 然后置 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴热激 90 s (热激是关键步骤, 准确达到热激温度非常重要), 不要摇动管, 迅速放入冰浴 2 min。

3) 向每管样品中加入 800 μL LB 培养基, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床, 100~150 r/min, 振荡保温 45~60 min, 即得转化混合物。在上述步骤中, 同时做一个只加细菌不加 DNA 的样品作阴性对照。

4) 将转化混合物和未接触质粒 DNA 的对照细菌各 100 μL , 分别涂于含氨苄青霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 琼脂平板上, 室温下放置 20 min。

5) 待菌液被琼脂吸收后, 倒置平板于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 12~16 h, 观察结果。

五、实验结果

1. 自行设计表格记录实验结果。
2. 按照以下公式计算转化效率。

$$\text{转化效率} = \frac{\text{转化子总数}}{\text{DNA质粒加入量}(\mu\text{g})}$$

六、问题与讨论

1. 讨论实验中影响细菌质粒转化的因素有哪些。
2. 本转化实验中, 质粒的浓度是否越高越好?

七、参考文献

- 黄秀梨, 辛明秀. 2008. 微生物学实验指导. 2 版. 北京: 高等教育出版社.
- 沈萍, 陈向东. 2007. 微生物学实验. 4 版. 北京: 高等教育出版社.
- 杨苏声, 周俊初. 2004. 微生物生物学. 北京: 科学出版社.
- 周德庆. 2011. 微生物学教程. 3 版. 北京: 高等教育出版社.
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. 2005. 精编分子生物学实验指南. 4 版. 马学军, 舒跃龙等译. 北京: 科学出版社.

实验二 一步法制备和转化大肠杆菌感受态细胞

一、实验目的

1. 了解常用的转化原理和方法。
2. 比较不同转化方法的优缺点。
3. 掌握一步法制备和转化大肠杆菌感受态细胞的方法。

二、实验原理

细菌受体细胞的转化方法是基于物理学和生物学原理建立起来的, 1983年, Hanahan设计了一套用二甲基亚砜(DMSO)和二巯基苏糖醇(DTT)诱导细胞产生高频感受态的程序, 从而大大提高了大肠杆菌的转化效率, 获得高达 5×10^8 个转化菌/ μg 超螺旋质粒DNA的转化效率。目前常见的转化方法有 CaCl_2 转化、聚乙二醇(PEG)介导的原生质体转化和电转化等。一步法制备和转化大肠杆菌感受态细胞是1989年由Chung改进并报道的, 以PEG、DMSO和 Mg^{2+} 为主要成分配制TSS溶液, 一步实现感受态细胞制备和转化的方法。该方法中聚乙二醇为多糖类物质, 可能有促使质粒DNA与感受态细胞膜结合的作用, 与 Mg^{2+} 及葡萄糖共同促进质粒转化。

(一) 转化效率影响因素

转化效率的高低受多种因素的影响, 包括受体菌类型、细菌的生长状态、DNA分子的大小和浓度、试剂的纯度、玻璃和塑料器皿的清洁度等。

1. 受体菌类型

一步法适用于很多分子克隆中常用的大肠杆菌, 如MM294、DH5 α 、DH1、JM109、LE392、XL-1、HB101、SCS-1和RR1等, 但不同菌株的感受态效率略有差别, 其中MM294效率最高, 为 $(6.03 \pm 0.50) \times 10^7$ 个转化子/ μg 超螺旋质粒DNA, 而RR1相对来说效率较低, 为 $(0.49 \pm 0.03) \times 10^7$ 个转化子/ μg 超螺旋质粒DNA, 笔者在教学实践中也尝试使用S17-1, 获得了高于DH5 α 的转化效率。

2. 细菌生长状态

细菌生长状态对转化效率影响较大, 由于未知的原因, 直接取冻存于 -70°C 低温冰箱中的菌株可以获得更高的转化效率。菌株在对数生长前期($\text{OD}_{600}=0.35 \sim 0.55$)及稳定期($\text{OD}_{600}=0.9$)可获得最高感受态效率, 由于稳定期时间不易控制, 通常选择对数生长前期, 超过这个时期, 感受态效率将以数量级递减。

3. DNA分子大小、纯度和浓度

大于15 kb的质粒及纯度较低的质粒DNA均对转化效率有影响。一步法中最适

DNA浓度为100 pg~1 ng, 1 ng~1 μg浓度质粒DNA将降低转化效率。当用连接产物做转化时, 相对于超螺旋质粒DNA的转化效率至少降低2个数量级, 每微克连接产物DNA所能获得的真正转化子取决于连接反应所产生的重组质粒的量, 以及转化反应中的抑制物, 如酶等成分。

4. 试剂的纯度

使用高纯度的水、DMSO、PEG制备感受态细胞是最重要的, 例如, DMSO的氧化产物推测是二甲硫醚, 是转化的抑制物。包括细菌培养基成分在内的某些试剂会随着贮存期的延长而降低功效, 因此, 尽可能使用新买的试剂和培养基。

5. 玻璃和塑料器皿的清洁度

微量的洗涤剂或其他化学物质会大幅度降低细胞转化效率, 因此, 最好建立一批专门用于制备感受态细胞的专用容器, 并且使用前用超纯水充满后, 高温灭菌后再使用。

一步法制备和转化感受态细菌能得到 CaCl_2 转化方案中的转化率 ($10^6 \sim 10^7$), 但操作更为简便, 不需热激, 并且冰浴时间要求不严格, 在 5~60 min 能获得同样的转化效率, 此外, 制备的感受态细胞可以直接保存于-70 °C低温冰箱, 在 180 天内保持较好的转化效率。因此, 该方法可以满足实验室常规克隆的需求, 操作步骤简便, 重复性好, 有利于在实验室中大规模推广和应用。

(二) 转化子的鉴定

实际研究工作中, 通常需要转化的是重组质粒, 对含有重组质粒菌株进行鉴定, 除了需要抗性筛选外, 常见的方法还有以下几种。

1. α -互补

许多载体(如 pUC 系列)都带有大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)的启动子及其编码 α -肽链的 DNA 序列, 在 α -肽链的 DNA 序列中包含着保持可读框的多克隆位点, 当这种载体与可编码 β -半乳糖苷酶 C 端部分序列的宿主细胞(如 DH5 α 和 JM109)共同存在时, 便会产生有功能活性的 β -半乳糖苷酶分子, 在生色底物 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(X-gal)和诱导物异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)存在下形成蓝色菌落。若外源 DNA 片段插入到质粒的多克隆位点后, 会阻断 α -肽链的合成, 因此含有重组质粒的克隆是无色的, 可以与含有非重组质粒的克隆所形成的蓝色菌落明显地区别开来。然后通过小量提取质粒进行限制性酶切分析, 就可以确证质粒的结构。

2. 重组质粒快速鉴定(Cracking)

重组质粒中由于含有外源 DNA 片段而比非重组质粒的分子质量大, 因此, 以 1×Cracking buffer (2×Cracking buffer: 0.2 mol/L NaOH, 0.5% SDS, 0.05%溴酚蓝, 20%蔗糖)裂解少量细菌细胞, 直接电泳会发现白色重组质粒 DNA 的迁移率比蓝色菌落中的非重组质粒 DNA 的迁移率慢, 由此即可初步对重组质粒进行鉴定区分。

3. 菌落 PCR

以单菌落制备的菌悬液为 PCR 扩增的模板, 选择重组质粒上合适的引物(可选

择多克隆位点两侧的引物,或利用目的基因序列设计引物),PCR 扩增后,电泳检测扩增条带的大小是否正确,以鉴定重组质粒是否转化成功。

4. 小规模制备质粒 DNA 进行限制性酶切分析

限制性内切酶(restriction endonuclease)能识别 DNA 分子中的特异序列,并在此特异位点将双链 DNA 切断。根据重组质粒酶切图谱分析的结果,选择合适的限制性内切酶对少量制备的质粒进行酶切,并电泳检测其正确性,同时以空载体作为阴性对照。

5. 杂交筛选

以目的基因标记探针,通过 Southern 印迹,确定是否有阳性信号,对重组质粒进行鉴定。

6. 报告基因的检测

若重组质粒中外源整合基因片段为报告基因,也可以检测报告基因的表达,直接确定其正确性。在实际工作中,前 4 种方法比较简便而通用。

本实验中选择的转化质粒 pMP2444 是在广宿主载体 pBBR1MCS-5 多克隆位点中整合了 *gfp* 报告基因的重组质粒。*gfp* 基因编码绿色荧光蛋白,由于其光毒性弱,非常适合标记活细胞,且不需要底物诱导,广泛应用于分子标记、药物筛选、融合抗体、信号转导等研究领域。

三、实验材料

1. 菌种和质粒

菌种 大肠杆菌 (*E. coli*) S17-1: *pro thi recA hsdR* (RP4-2 Km^r : Tn7 Tc^r : Mu, 整合在染色体中) Sm^r Spe^r

质粒 pMP2444 (图 2-1): *gfp*, Gm^r, 来源于广宿主范围载体 pBBR1MCS-5

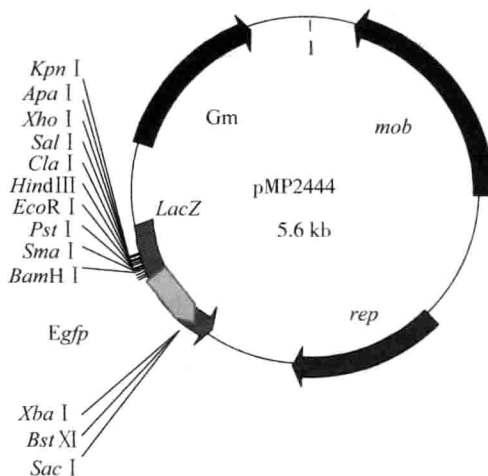


图 2-1 pMP 2444 质粒构建图谱 (Stuurman, 2000)

2. 培养基

LB 培养基, 配方见实验一。

3. 抗生素

培养转化子的庆大霉素终浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$, 用水配制 40 mg/mL 的贮备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4. 溶液或试剂

TSS: LB 培养基中含有 10% PEG3350 或 PEG8000, 5% DMSO, 20~50 mmol/L Mg^{2+} (MgCl_2 或 MgSO_4), 用 HCl 或者 NaOH 调整 pH 为 6.5, 或配置 2×TSS, 使用前 1:1 稀释。0.22 μm 滤器过滤除菌。4 $^{\circ}\text{C}$ 储存, 保质期约 6 个月。

注意: ①PEG 浓度 $>20\%$ 或 $<5\%$ 将无转化效果, 浓度在 5%~14%有 10^7 个转化子/ μg 超螺旋质粒 DNA 以上转化率, 其中 PEG 浓度为 10%时转化效率最高, 为 10^8 个转化子/ μg 超螺旋质粒 DNA; ②pH >8 或 <4 将无转化效果, 在偏酸性 pH6.5~6.8 时转化效率较高; ③PEG3350 或 PEG8000、DMSO 购自 Sigma 公司, 胰蛋白胨、酵母粉购自英国 Oxoid, LB 配制好后自然 pH 在 6.8 左右; ④所有配制试剂的试剂瓶或三角瓶需手洗干净, 用双蒸水充满灭菌, 倾倒水后使用, 保证其洁净度。

四、实验步骤

(一) 纯化及活化菌种

1) 将保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 甘油管中的受体菌株大肠杆菌 (*E.coli*) S17-1 直接刮取少量菌体接种于 LB 液体培养基中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16~20 h (注意: 前期可将平板纯化后的单菌落接种到液体培养基中, 培养至对数期后, 离心收集菌体, 以 15%甘油悬浮后保藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 可多保藏几份, 每次取 1 支使用)。

2) 按 1%接种量转接到新鲜的 20 mL 的 LB 培养液中 (20 mL/250mL 三角瓶), 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 2~3 h, 当其 OD₆₀₀ 为 0.35~0.55 时 (细胞数 $<10^8$ 个/mL), 即细胞生长的对数期, 立即取出冰浴 30 min。

(二) 制备和转化感受态细胞

1) 4 $^{\circ}\text{C}$, 3500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 收获细菌。加入原体积 1/10 (这里为 2 mL) 的 1×TSS 液 (冰预冷) 悬浮细胞, 然后分装成 100 μL /份, 全部冰上操作, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2) 转化时取 1 管 (100 μL) 感受态细菌 (冰冻细胞应置于冰上缓慢融化后立即使用) 加入 1~2 μL DNA (0.1~1 ng), 轻轻混匀后冰浴 5~60 min (注意: 冰浴 5 min 与 60 min 转化效率变化不大, 通常建议冰浴 30 min)。在上述步骤中, 同时做一个只加细菌不加 DNA 的样品作对照。

3) 加入 0.9 mL 含 20 mmol/L 葡萄糖的 LB 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 温和振荡

培养 40~60 min。

4) 涂布 100 μL 转化液至 LB+庆大霉素 (Gm) (40 $\mu\text{g/mL}$) 平板, 涂布均匀, 室温放置 10~20 min, 直至所有菌液被培养基吸收后, 放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱过夜培养 (17~20 h)。

(三) 转化子的鉴定

转化子的鉴定可以选择以下方法中的任意一种。

1. 报告基因检测

挑取 1~5 个单菌落重新转接 LB+Gm (40 $\mu\text{g/mL}$) 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16~18 h。Olympus 落射式荧光显微镜 PM-20 (激发光波长 480 nm, 发射光波长 520 nm), 观察转化子明亮的绿色荧光。

2. 重组质粒快速鉴定 (Cracking)

如方法 1 活化不同单菌落, 用无菌牙签挑取少许菌落于 Eppendorf 管的底部, 加入 20 μL 1×Cracking buffer (2×Cracking buffer: 0.2 mol/L NaOH, 0.5% SDS, 0.05% 溴酚蓝, 20%蔗糖), 在旋涡器上剧烈振荡 3~5 min, 同时以空载体 pBBR1MCS-5 菌落作阴性对照, 离心后吸取上清在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳, 并记录不同菌落电泳条带的迁移位置。

3. 质粒少量制备酶切验证

按附录 3 少量提取质粒, 选择 *gfp* 基因整合位点两侧的限制性内切酶进行酶切, 如 *Bam*H I 和 *Xba* I, 参照 TaKaRa 公司限制性内切酶使用说明, 选择合适的双酶切缓冲液和酶切温度, 注意内切酶加入体积不能超过总体积的 1/10, 加入过多反而抑制酶活性。酶切后电泳检测酶切图谱的正确性。

五、实验结果

1. 记录转化子数目, 计算转化效率。
2. 记录绿色荧光蛋白表达的结果。

六、问题与讨论

1. 一步法制备和转化大肠杆菌感受态细胞实验中影响转化效率的主要因素有哪些?
2. 重组质粒转化子的鉴定方法有哪些? 针对本实验最简便的鉴定方法是哪个?

七、参考文献

Chung C T, Niemela S L, Miller R H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2172~2175.