

高效、快速地将外源 DNA 导入根癌土壤杆菌

崔武 刘炜 吴光耀

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘要 室温下用 50mmol/L CaCl_2 处理根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 以制备感受态细胞, 然后经 0℃ 冰浴及 28℃ 热击处理, 成功地将 Ti 质粒中间载体 (>10kb) 导入了根癌土壤杆菌中。转化效率每个活细胞可达 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 转化子或 10^6 转化子/ μgDNA 。探讨了该菌细胞生长状态、 CaCl_2 溶液浓度、温度、液氮、热击、复苏时间以及感受态细胞于 4℃ 或 -20℃ (加 15% 甘油) 下保存时间对根癌土壤杆菌转化的影响。

关键词 转化, Ti 质粒, CaCl_2 , 根癌土壤杆菌

在植物基因转化中, 将携带外源基因的 Ti 质粒中间载体导入根癌土壤杆菌 (本文以下简称土壤杆菌) 是使用土壤杆菌介导的 Ti 质粒转化系统的关键技术。由于土壤杆菌的特殊性, 如生长速度较慢, 含有 200kb 左右的大的 Ti 质粒等, 利用常规的大肠杆菌转化方法不能获得满意的转化效果。Holsters^[1] 等首先采用了冻融法 (Freeze-thaw method) 将 Ti 质粒导入土壤杆菌中, 转化效率只有 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ (转化子总数/总的活细胞数)。Nishiguchi^[2] 等改进了此方法, 将转化效率提高至 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 。目前广泛采用的三亲交配法 (Tri-parental conjugation)^[3] 转化时需用 3 种菌株, 需时较长 (2d), 操作又较繁琐。本文所报告的方法方便、快速, 可将 Ti 质粒中间载体直接导入土壤杆菌, 转化效率可达 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 转化子数/活细胞数, 可获得 10^6 转化子/ μgDNA , 转化时间只要 1~5h。

1 材料与方 法

1.1 菌株和 DNA

1.1.1 培养基: YEB 培养基为 1L 溶液含 5g beef extract, 1g yeast extract, 5g tryptone, 5g sucrose 和 2mmol/L MgSO_4 , pH7.2。固体培养基含 1.5% Agar。

1.1.2 抗生素: 使用浓度为 Streptomycin (Sm) 200 $\mu\text{g/ml}$, Kanamycin (Kan) 50 $\mu\text{g/ml}$, Ampicillin (Amp) 50 $\mu\text{g/ml}$; Spectinomycin (Spe) 100 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.1.3 土壤杆菌菌株 LBA4404: Sm^+ , Amp^- , Kan^- , Spe^- 。

1.1.4 DNA: pBI121: 12.8kb 的双元 Ti 质粒载体, Kan^+ , pE3: 12.4kb 的共整合 Ti 质粒载体, Spe^+ , pGEM3Zf (+): 3.2kb 常规的克隆及测序载体, Amp^+ 。

1.2 土壤杆菌感受态细胞的制备

冻存的 LBA4404 菌种接种到 YEB 液体培养基中 (Sm^+), 28℃ 振荡培养至 OD_{600} 达到 0.3~0.4, 然后室温下 1 000 $\times g$ 离心 5min, 用 4/5 原体积的 50mmol/L CaCl_2 溶液重悬后同样条件离心, 再用 1/10 原体积的 50mmol/L CaCl_2 溶液重悬, 以 100 μl 的小份分

装于 1.5ml 无菌的离心管中, 4℃ 放置备用或加入 15% 甘油冻存。

1.3 土壤杆菌感受态细胞的转化

取 1 份土壤杆菌感受态细胞 (100 μ l), 加入适量 DNA 后混匀, 0℃ 冰上放置 10~20min, 28℃ 水浴保温 5min, 0℃ 冷却, 加入 500 μ l YEB 液体培养基, 28℃ 缓缓振荡培养 (<250r/min) 1~5h, 取适量菌液梯度稀释后分别涂布于只含 Sm 和同时含 Sm 及筛选抗生素的 YEB 固体培养基上, 28℃ 放置 36h 左右可见菌落长出。分别计算活细胞总数和转化子总数, 转化效率以转化频率 (转化子总数/活细胞总数) 或转化子总数/ μ gDNA 表示。

2 结 果

2.1 土壤杆菌细胞的生长状态对转化的影响

连续测定了 pBI121 质粒对 OD₆₀₀ 从 0.1~1.0 之间不同生长阶段的土壤杆菌制成的感受态细胞的转化情况 (图 1)。结果表明, 其中 OD₆₀₀=0.4 左右时转化子数/ μ gDNA 值达到最大, 此亦即制备感受态细胞的最佳时期。当 OD₆₀₀ 在 0.3~0.6 之间时, 转化子总数/ μ gDNA 均在 5.0 $\times 10^5$ 以上。

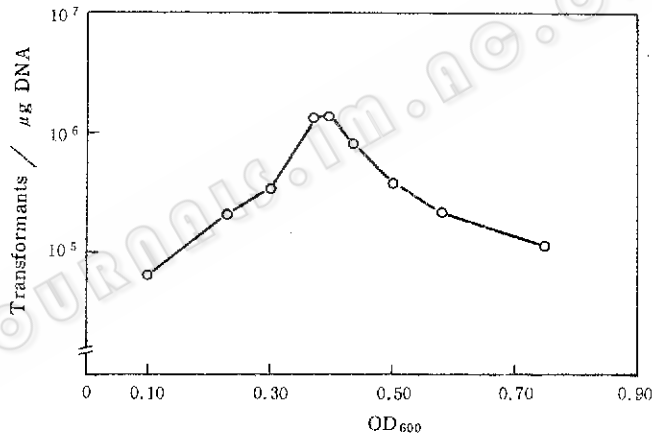


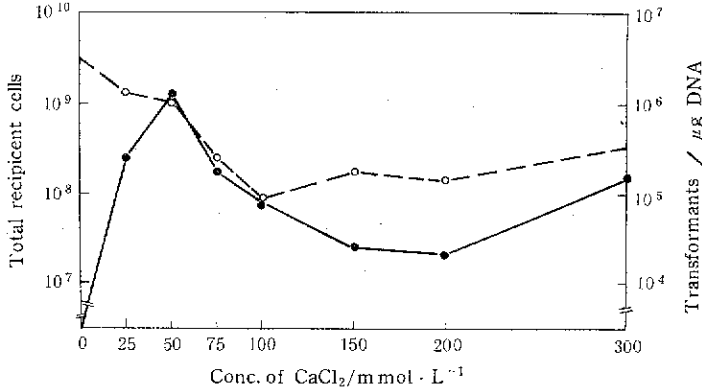
图 1 根瘤土壤杆菌细胞生长状态对转化的影响

Fig. 1 Effect of the growth stage of *A. tumefaciens* cells on transformation. OD₆₀₀ represents the growth stage of LBA4404. Transformation experiment was carried out as described in methods. (—), Number of transformants per μ g DNA (all cells were grown at 28℃ for 3 hours for the expression of the antibiotic resistant gene.)

2.2 CaCl₂ 溶液浓度对转化的影响

用 0~300mmol/L 范围的不同浓度的 CaCl₂ 溶液分别处理, 结果表明 (图 2): 随着 CaCl₂ 浓度增大, 存活细胞总数持续下降, 至 100mmol/L 时最低, 以后又逐渐有所回升; 转化子总数/ μ gDNA 值则迅速上升, 至 50mmol/L 左右时达到最大 (>1.0 $\times 10^6$), 以后又持续下降, 但在高浓度时 (>200mmol/L) 又有所回升。这种高浓度下存活细胞数及转化子/ μ gDNA 值的回升可能是因为高浓度 CaCl₂ 处理引发了细胞内部的抗逆反应机制造成的。

2.3 制备感受态细胞时的温度对转化的影响

图2 CaCl₂ 溶液浓度对转化的影响Fig. 2 Effect of CaCl₂ concentration on transformation

(---): Number of total recipient cells.

分别研究了室温、冰浴(0℃)及-20℃三种条件下制备的土壤杆菌感受态细胞的转化情况(表1),结果表明用于土壤杆菌感受态细胞制备的最适温度是室温(20℃左右),而不是通常制备感受态细胞时使用的0℃⁽³⁾, -20℃条件则不仅使活细胞总数下降,而且会造成细胞接受外源DNA的能力显著降低,这说明CaCl₂处理的转化效果与细胞所处的生理状态密切相关。

表1 感受态细胞制备时的温度对转化的影响

Table 1 Effect of temperature on transformation

Temperature / °C	Number of total cells/ml (×10 ⁹)	Number of transformants / μg DNA (×10 ⁶)	Transformation frequency (×10 ⁻⁴)
Room temperature	1.7	1.4	4.3
0	1.6	0.80	2.5
-20	1.4	0.05	0.19

A. t LBA4404 cells were grown to about OD₆₀₀ 0.4, then placed at different temperature for 10min, the pellet was re-suspended in 50 mmol/L CaCl₂, placed at the same temperature for another 5min, and the next steps were the same as the protocol described in the materials and methods. Transformation frequencies are expressed as the No. of total transformants over the No. of total recipient cells.

2.4 外源DNA与土壤杆菌感受态细胞共放置时温度的影响

结果见表2。转化效率以0℃下最高,室温及-20℃条件下则显著降低。室温降低了1个数量级;-20℃则降低了3个数量级。与制备感受态细胞时的温度影响相比,此时-20℃处理的负效应大大增加。

2.5 液氮处理及热击等条件的影响

液氮处理是热击前先将转化混合物在液氮中放置2min。表2的结果表明:不用液氮处理的28℃热击下转化效率最高(2.4×10⁶转化子/μgDNA),比37℃热击高了近1倍。液氮速冻后转化频率基本稳定在10⁻⁴,但由于活细胞总数的显著下降致使转化子数/μgDNA值与未用液氮处理相比下降了2~4倍。不使用液氮和热击处理,转化效率虽降低但转化频率仍有1.2×10⁻⁴,转化子/μgDNA值可达0.40×10⁶,这个结果完全可满足

常规的克隆转化实验要求。

表 2 转化条件对转化的影响

Table 2 Effect of conditions on transformation

Conditions			Number of total	Number of transfor-	Transformation
Incubation temperature when compe-	Frozen by	Temperature of	recipient cells/ml	mants/ μgDNA	frequency
tent cells were mixed with DNA/ $^{\circ}\text{C}$	liquid N_2	heat shock/ $^{\circ}\text{C}$	($\times 10^9$)	($\times 10^6$)	($\times 10^{-4}$)
Room temperature	No	37	1.8	0.24	0.66
0	No	No	1.6	0.40	1.2
* 0	No	28	1.4	2.4	8.3
0	No	37	1.6	1.4	4.3
0	Yes	28	0.87	0.60	3.6
0	Yes	37	0.95	0.87	4.6
-20	No	37	0.37	0.003	0.40

Frozen by liquid N_2 was done before heat shock for 2min.

* , Standard transformation protocol

2.6 加入 YEB 培养基后, 28 $^{\circ}\text{C}$ 抗性复苏时间的影响

由于土壤杆菌的生长较为缓慢, 抗性表型的表达亦需一定时间, 所以测定了加入 500 μl YEB 液体培养基后 1~5h 的转化效率 (图 3), 发现转化频率基本稳定在 4.0×10^{-4} , 说明培养 1h 后转化子即已抗性复苏完全, 转化子数/ μgDNA 值在培养 1、3、5h 后分别达到 6.0×10^5 , 1.4×10^6 和 2.1×10^6 , 本实验中选择了培养 3h。

2.7 DNA 加入量对转化的影响

以 OD_{600} 为 0.4 的土壤杆菌为材料制成感受态细胞, 分别加入不同量的 DNA, 经过 3h 的抗性复苏后, 研究其对转化效率的影响。表 3 表明在此条件下当加入 pBI121 质粒近 200ng 左右时转化子/ μgDNA 值达到最大, 以后则随 DNA 量的增加转化效率却不断下降, 说明感受态细胞的容受能力在加入 200ngDNA 时已达到饱和。

表 3 DNA 加入量对转化的影响

Table 3 Effect of the amount of DNA on transformation

The amount of DNA/ng	25	75	150	225	300	375	450	600
Number of transformants/ $\mu\text{g DNA}$ ($\times 10^6$)	0.96	0.96	1.1	1.9	1.6	0.26	0.14	0.07

* , DNA was pBI121 (12.8kb).

2.8 感受态细胞放置时间对转化的影响

分别研究了 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的土壤杆菌感受态细胞随时间的延续其转化效率的

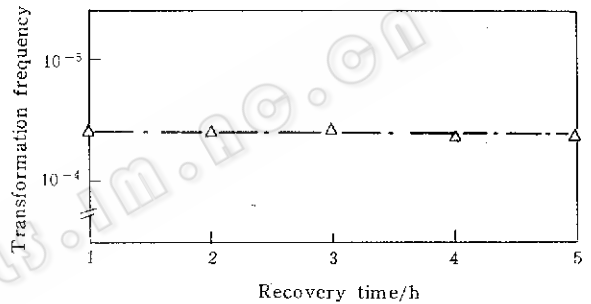


图 3 转化子复苏时间与转化频率

Fig. 3 Relation between recovery time of transformants and transformation frequency

The tubes were shaken at 28 $^{\circ}\text{C}$ for 1 to 5 hours after the addition of 500 μl YEB.

(- - -), Transformation frequency

变化(图4、5)。4℃下,感受态细胞的转化效率在2h内显著下降,放置2h后即只有初始时的1/5;以后在48h内基本稳定在 2×10^5 转化子/ μg DNA,其中在9~15h间有一个小的回升,最高可达 4×10^5 ;放置48h以后则持续下降,至96h已只有初始的1% (图4)。

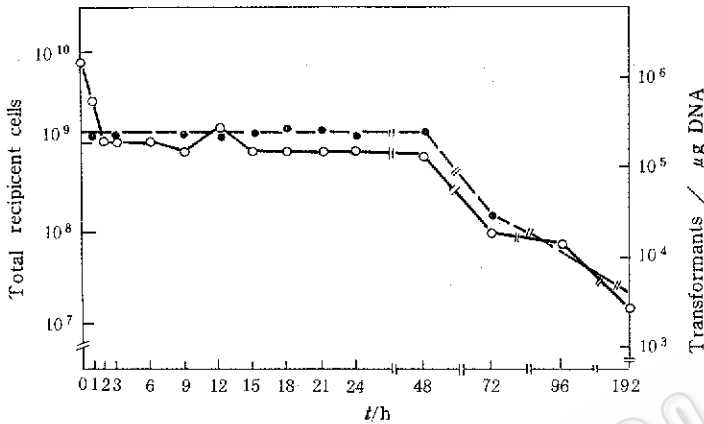


图4 根瘤土壤杆菌感受态细胞4℃放置时间对转化的影响

Fig. 4 Effect of time of storage at 4°C on transformation

The competent *A. tumefaciens* cells were placed at 4°C for different time before the transformation experiment.

加甘油后在-20℃冻存的感受态细胞转化效率(图5)在2d内基本稳定,1周后仍有1/3,但以后即持续显著下降,15d时转化子/ μg DNA值已只有初始的1/50。

2.9 应用该方法转化不同类型质粒的结果

分别用 pGEM3zf (+) 和 pE3 依同样的方法进行了转化实验,均得到了可与 pBI121 转化相类比的结果,转化效率均在 1×10^6 转化子/ μg DNA 左右。

3 讨论

Holsters 等和 Nishiguchi 等使用的冻融法转化是用 10mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 处理细胞,要求-70℃(或液氮)速冻及 37℃热击, Nishiguchi 的改进方法还要求在加入 YEB 后复苏培养 12h, 这些方法的转化效率最高只能达到 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ 转化

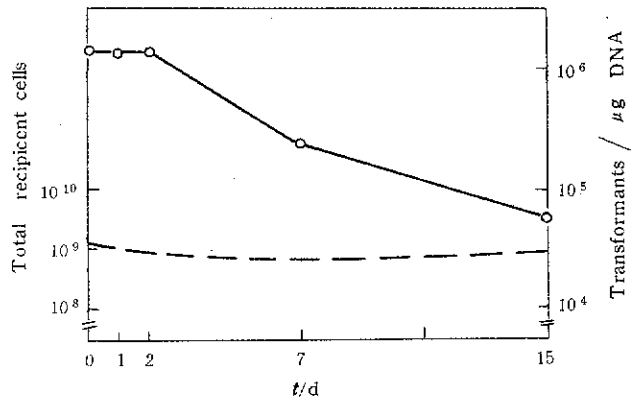


图5 根瘤土壤杆菌感受态细胞冻存的时间对转化的影响

Fig. 5 Effect of time of storage at -20°C on transformation

The competent cells were mixed with 15% glycerin immediately, then stored at -20°C for different days.

子数/活细胞数。我们使用的方法则可达到 10^{-4} 转化子数/活细胞数, 可得到 10^6 转化子/ μgDNA , 而且没有速冻处理, 热击依具体要求也可省略, 复苏培养时间仅需 1~5h, 转化步骤大大简化, 效率显著提高。

目前广泛使用的三亲交配法需使用 3 种不同功能的菌株, 而且除菌株的培养时间外, 仅中间转化过程即需 2d 左右的时间, 而我们的方法只需一种菌株和几个小时的时间。应用该方法已使得在土壤杆菌中直接筛选重组的 Ti 质粒载体成为可能, 这更是三亲交配法所无法完成的。

实验证明, 50mmol/L CaCl_2 溶液室温下处理土壤杆菌细胞可获得最佳转化效率的感受态细胞, 而常规的用于 *E. coli* 细胞转化的 CaCl_2 法⁽³⁾所使用的 100mmol/L CaCl_2 及 0°C 处理被证明对土壤杆菌细胞来说是效率很低的。另外, 还发现加甘油冻存的土壤杆菌感受态细胞融化后若立即用于转化, 则转化效率虽然以 0°C 下最高, 但室温与 -20°C 条件下亦无显著降低。

对转化前后的质粒 DNA 均经过了限制酶酶切鉴定, 证明为同一种质粒且未发生酶切位点的变化, pBI121 转化的 LBA4404 菌株侵染烟草已经获得了转基因植株。

参 考 文 献

- (1) Holsters M, D de Waele, Depicker A *et al.* Mol. Gen Genet, 1978, 183, 181.
- (2) Nishiguchi R, Takanami M, Oka A. Mol Gen Gent, 1987, 206, 1.
- (3) Sambrook J, E F Fritsch, T Maniatis. Molecular Cloning; A laboratory manual (2nd, edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1. 74~1. 84.

Rapid, High Efficient Transformation of Foreign DNA to *Agrobacterium tumefaciens*

Cui Wu Liu Wei Wu Guangyao

(College of Life Science, Peking University, Beijing 100871)

Abstract A successful transformation of Ti plasmid vector ($>10\text{kb}$) to *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t*) was described. Competent *A. t* cells were prepared with 50 mmol/L CaCl_2 at room temperature and transformation was done in ice bath followed by 28°C heat pulse. The transformation efficiency is $10^{-4}\sim 10^{-5}$ transformants/recipient cells or 10^6 transformants per $\mu\text{g DNA}$. Moreover, the effects of grown stage of *A. t* cells, concentration of CaCl_2 solution, temperature, liquid N_2 , heat pulse, recovery time and storage time of competent *A. t* cells at 4°C or -20°C (mixed with 15% glycerin) on transformation were studied.

Key words Transformation, Ti plasmid, CaCl_2 , *Agrobacterium tumefaciens*