

酵母完整细胞快速高效转化法

毛小洪 蔡金科

(中国科学院微生物研究所, 北京)

通过研究影响转化效率的诸因素, 最终找到一种快速、高效酵母完整细胞转化法。整个转化步骤能在1.5h内完成。在实验中发现: 小牛胸腺DNA的加入, 在加入DNA后随即加入PEG4000; 将42℃热冲击时间从5min延长到25min; 热冲击后直接将转化混合物涂布到选择性平板上能得到高效转化效率。所用四种类型质粒的转化效率如下: YRp: $3.5-7.2 \times 10^4$ (线性pCN60/BamH I: 1.6×10^5); YEp: $1.7-2.6 \times 10^4$ (线性YEp13/BamH I: 8×10^4); YCp: 3.7×10^4 ; YIp5/Stu I: 7.6×10^3 。用快速法检测的7株受体菌的转化能力都达到 10^4 个转化子/ μg DNA。

关键词 *S. cerevisiae*完整细胞转化法; 小牛胸腺DNA; 热冲击; 转化效率; 受体菌; 质粒DNA

转化是酵母菌基因操作技术中重要的步骤之一。1978年Hinuen等和Beggs首先报道了质粒DNA转化酿酒酵母原生质体细胞获得成功^[1,2], 这种转化方法称为原生质体转化法, 它的转化效率较高, 一般可达 10^3-10^4 个转化子/ μg DNA。但该法原生质体制备及再生步骤繁琐、菌落再生时间较长(4-6天), 转化子多倍体化频率高, 因此给转化子的遗传及生化检测带来困难, 而且有时因原生质体的形成率低或再生频率低而影响转化效率。Ito等提出了另一种酵母转化方法——完整细胞转化法^[3,4], 该法不用制备原生质体, 简便易行, 转化效率为50-600个转化子/ μg DNA, 一般三天便可得到转化子。在我们的实际操作中, 发现Ito法的转化效率较低, 一般只能得到50-80个转化子/ μg DNA的转化效率, 因此给酵母菌基因克隆工作带来了困难。已有一些报道指出Ito法转化效率低的缺陷^[5,6]。

本文在Ito法基础上对完整细胞转化方法做了改进, 研究了影响转化效率的几个因素, 最终摸索出一种适用于各种酵母

载体的快速、高效转化方法, 转化效率高达 10^4 个转化子/ μg DNA以上(YRp、YEp、YCp型质粒)。

材料和方法

(一) 菌株和质粒

实验所用菌株和质粒见表1和表2。

(二) 酶和重要试剂

限制内切酶Bgl II为Boehringer Mannheim公司产品; Stu I为美国Promega公司产品; 溶菌酶为美国Serva公司产品; PEG4000为日本进口分装; 小牛胸腺DNA购自华美生物工程公司; LiAc为北京化工厂产品。

(三) DNA制备及酶切

1. 质粒DNA制备: 参照“分子克隆”一书进行^[7], 并用CsCl密度梯度离心纯化。

2. 小牛胸腺DNA(Carrier DNA)制备: DNA用10mmol/L TE缓冲液(pH

本文于1989年1月12日收到。

表 1 实验用菌株
Table 1 List of strains

菌株 Strain	基因型 Genotype	来源 Source
<i>S. cerevisiae</i>	50.L4	Dean H. Hamer 赠
	YIY4B-3	Ichiro YamaShita 赠
	YIYD	同上
	DP-1	P. P. Slonimski 赠
	YD-23B-2-3A	本实验室构建
	YD-23B-2-5A	本实验室构建
YD-23B-2-6A	本实验室构建	
<i>E. coli</i>	C600	本所冯国宏 赠
	F ⁻ thi ¹ thr ¹ leu B ₆ lacY tonA ₂₄ pro ⁻ supE ₄₄ λ ⁻ γ ⁻ m ⁻	

表 2 实验用质粒
Table 2 List of plasmids

质粒 Plasmid	类别 Type	复制起点 Replication origin	选择标记 Selective Marker	来源 Source
pCN60	YRp	ARS 1	TRP 1	本组构建
YEp13	YEp	2μm	LEU 2	本组保藏
RC4	YCp	ARS 1	TRP 1	Dean H. Hamer 赠
YIp5	YIp	无	URA 3	本组保藏

7.8) 溶解, 剧烈振荡 10min, 100°C 水浴加热 20min, 再剧烈振荡 10min, 终浓度为 3—5μg DNA/μl。

(四) 酵母细胞的转化^[8]

将活化的酵母细胞接种于 50ml YEPD 液体培养基中, 28°C 振荡培养至对数生长期时离心收集, 菌体用无菌水洗一次后用 0.75ml 0.1mol/L LiAc-0.01mol/L TE 缓冲液悬浮, 28°C 振荡培养 1h, 然后取 0.1ml 装入 1.5ml Eppendorf 管中, 加入 12 μg 左右的 Carrier DNA 和 0.1—1μg 质粒 DNA (最多不超过 10μl), 混匀后 28°C 静置 30min, 再加入 0.7ml 40% PEG4000、0.1mol/L LiAc-0.01mol/L TE, 混匀后 28°C 静置 30min, 42°C 水浴中放置 5min, 离心 2s。收集菌体, 用无菌水洗两次, 再悬浮于 0.2ml 无菌水中, 涂布至选择性

平板上, 28°C 培养 3 天后长出转化子。

结 果

(一) 小牛胸腺 DNA 对转化效率的影响及基本转化程序的建立

已有文献报道在酵母转化过程中加入鲑鱼精 DNA 或 *E. coli* 染色体 DNA 作为 Carrier DNA 可提高转化效率^[8,9]。我们在实验中证明小牛胸腺 DNA 也有同样的效果, 同时修改了转化程序, 研究其中各因素对转化效率的影响, 结果见表 3。

从表 3 结果中可发现: (1) 小牛胸腺 DNA 的加入可使转化效率大幅度提高, 比对照组提高 100—200 倍左右 (2) PEG4000 和 DNA 一起加入细胞悬浮液中比加 DNA 后先保温一段时间, 再加入

表 3 酵母菌完整细胞高效转化程序的建立

Table 3 Establishment of basic transformation procedure for yeast intact cell

处理方式 Means of treatment	分组号 Sample No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Calf thymus DNA (μg)	~12	~12	~12	~12	~12	~12	~12	0	~12
Plasmid DNA pCN60 (μg)	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Incubation at 28°C for 30min.	+	+	+	-	-	-	-	+	+
0.7 ml PEG4000 0.1mol/L LiAc-0.01mol/L TE	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Incubation at 28°C	30'	1h	1h	30'	1h	1h	1h	1h	1h
Heat shock at 42°C for 5 min	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Wash once in H ₂ O	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Transformation efficiency*	3700	8000	128	9840	16000	9000	640	80	0

* 受体菌为50.L4, 每组用的细胞浓度为 1.0×10^8 cells/0.1ml

The recipient strain is 50.L4, cell density is 1.0×10^8 cells/0.1ml sample

PEG4000 得到的转化效率高2倍左右 (3) 42°C热冲击可使转化效率高出对照组25—60倍 (4) 加入PEG4000后, 28°C保温1h比保温30min得到的转化子数多1—2倍 (5) 42°C热冲击后直接涂布比用无菌水洗细胞后再涂布转化效率高1倍左右。

从实验组5转化程序得到的转化效率可达 1.6×10^4 个转化子/μg DNA, 比已报道的Ito法转化效率高出25倍左右, 以下转化程序除注明外均按实验组5进行。

(二) 小牛胸腺DNA的加入量对转化效率的影响

加入不同量的小牛胸腺DNA, 测定它们对转化效率的影响, 结果见表4。

表4结果表明, 转化效率随着小牛胸腺DNA的加入量增加而上升, 当其加入量约为12—15μg时, 转化效率最高, 比不加小牛胸腺DNA时的转化效率高200倍左右。

(三) 感受态细胞在4°C贮存对转化效率的影响

将悬浮于0.1mol/L LiAc中的酵母感受态细胞贮存于4°C, 于不同时间后取出测定其转化效率, 结果见表5。

表5结果表明, 感受态细胞于4°C贮存1—6天后, 转化效率降低37.5—55%,

表 4 小牛胸腺DNA加入量对转化效率的影响

Table 4 Effect of calf thymus DNA on transformation efficiency

小牛胸腺DNA加入量 Calf thymus DNA (μg)	转化子数*/μg pCN60 Number of transformants /μg pCN60
0	50—80
~3	1.8×10^3
~6	4.4×10^3
~9	1.0×10^4
~12	1.6×10^4
~15	1.6×10^4

* 表4—7中受体菌均为50.L4

The recipient strain is 50.L4 in Table 4—7

但采用高效转化程序, 6天后仍可达到 7.2×10^3 个转化子/μg pCN60的转化效率。

表 5 酵母感受态细胞4°C贮存对转化效率的影响

Table 5 Effect of storage of yeast competent cells at 4°C on transformation efficiency

4°C贮存时间 (天) Storage time at 4°C (day)	转化子数/μg pCN60 Number of transformants /μg pCN60
0	1.6×10^4
1	1.0×10^4
2	1.0×10^4
3	1.0×10^4
4	9.2×10^3
5	7.2×10^3
6	7.2×10^3

(四) 42°C热冲击对转化效率的影响

按表3中实验组5的转化程序, 仅延长

42℃热冲击时间，测定转化效率，结果见表6。

表6结果表明：延长42℃热冲击时间对转化效率有明显的提高作用，25min冲击可得到 6.4×10^4 的转化效率，比5min热冲击时的转化效率高3倍左右。

表6 42℃热冲击对转化效率的影响

Table 6 Effect of heat shock at 42℃ on transformation efficiency

42℃热冲击时间 Heat shock at 42℃ (min)	转化子数/μg pCN60 Number of transformants /μg pCN60
0	6.4×10^2
5	1.6×10^4
10	2.9×10^4
15	3.7×10^4
20	5.2×10^4
25	6.4×10^4

(五) 酵母菌不同类型质粒转化效率的测定

按表3实验组5的转化程序，仅延长42℃热冲击时间至25min，测定了不同类型酵母穿梭质粒：YRp、YEp、YcP、YIp的转化效率，结果见表7。

表7结果表明：YRp型质粒转化效率最高，比YEp和YcP型质粒高1—2倍，YIp型质粒的转化效率最低，但其线性分子YIp5/Stu I比环状分子的转化效率要高得多，可达 7.6×10^3 。YRp、YEp型质粒线性分子的转化效率可比环状分子高2—3倍。

由上述结果可以得出以下结论：我们找到了一种高效转化程序，适用于各种类型的酵母质粒，转化效率一般可达 10^4 以上（YIp5/Stu I可达 10^3 以上）。按此程序检测了7株酵母受体菌的转化能力，其转化效率均达到 10^4 以上（结果未给出），菌株之间转化能力的差异不大，仅相差1倍左右。由此证明了高效转化程序的通用性。

表7 不同类型质粒的转化结果

Table 7 Results of transformation with different plasmids by using efficient transformation procedure

质粒DNA Plasmid DNA	质粒类型 Plasmid type	转化子数/μg plasmid DNA Number of transformants /μg DNA
pCN60	YRp	6.4×10^4
线性pCN60/BamH I	YRp(线性)	1.6×10^5
YEpl3	YEp	2.6×10^4
线性YEpl3/BamH I	YEp(线性)	8.0×10^4
RC4	YcP	3.7×10^4
YIp5	YIp	< 1
线性YIp5/Stu I	YIp(线性)	7.6×10^3

(六) 快速、高效转化方法

在上述高效转化程序的基础上，我们省略用LiAc 28℃预处理细胞一步，在用0.1mol/L LiAc-0.01mol/L TE悬浮细胞的同时，直接加入DNA和PEG4000(见图1)同样可得到很高的转化效率，而且转化子长出所需的时间也略有缩短。

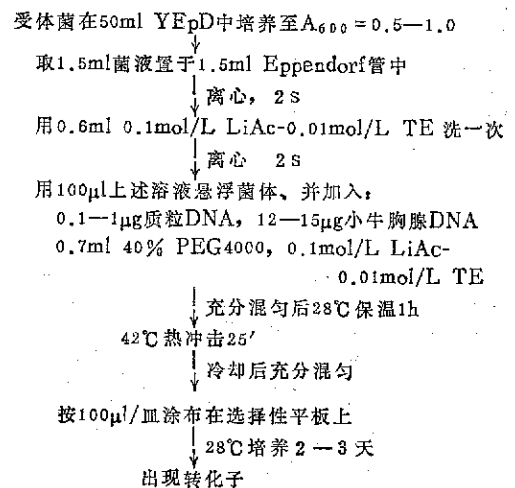


图1 快速、高效酵母完整细胞转化程序

Fig.1 A rapid and efficient procedure for transformation of *S.cerevisiae* intact cells

用以上方法检测了7株受体菌的转化能力，结果见表8。

表8结果表明，快速法得到的转化效率接近于最适转化程序得到的转化效率，均达到 10^4 以上，不同菌株之间的转化效

表 8 用快速法测定不同受体菌的转化效率

Table 8 Transformation efficiency of various recipient strains by using rapid and efficient transformation procedure

受体菌 Recipient Strain	质粒 DNA Plasmid DNA	转化子数/ μg DNA Number of transformants/ μg DNA
50.L4	YEp13	2.4×10^4
YIYD	YEp13	1.7×10^4
50.L4	pCN80	6.1×10^4
DP-1	pCN80	7.2×10^4
YD-23B-2-3A	pCN80	7.2×10^4
YD-23B-2-5A	pCN80	3.5×10^4
YD-23B-2-6A	pCN80	6.4×10^4

率相差无几,最高可达 7.2×10^4 。

讨 论

本文报道中的快速法简便易行,一般只要1个半小时即可完成全过程,转化子形成菌落时间也有缩短,转化效率受质粒及受体菌的影响不大,因此是目前最简便有效的完整细胞转化法,对于那些对蜗牛酶处理不敏感或原生质体再生困难的酵母受体菌尤为适用。

小牛胸腺DNA(Carrier DNA)在转化中可能起了保护质粒分子减少核酸酶降解的功能,因此使能有效进入细胞的质粒分子数目增加,转化效率升高。 42°C 热冲击是高效转化必不可少的一步,而且从5min延长到25min时效果更好,这与Ito等人报道的实验结果不同,他认为此步骤对转化效率影响不大,可以省略。改进的裂殖酵母完整细胞转化方法中将热冲击时间延长(同时提高温度),也可得到高频转化结果^[10]。这就提示: 42°C 热冲击时间延长是否促进了质粒分子与细胞膜的结合及吸收,使转化效率提高。另外,快速法中将用LiAc预处理细胞一步省略也得到很好的转化结果,可以认为转化过程中锂离子对酵母菌细胞膜结构的改变和膜与DNA的结合过程是同时发生的,减少锂离子对膜结构的损伤就使转化子出现的时间缩短。

在实验中还发现,YRp、YEp质粒的线性分子比超螺旋质粒分子的转化效率高,其原因尚不清楚,还需进一步研究,以便弄清酵母菌完整细胞质粒DNA转化的机制。

参 考 文 献

- [1] Hinnen, A. et al.; *Proc Natl Acad Sci USA*, 75:1929—1933, 1978.
- [2] Beggs, J.D.; *Nature*, 275:104—109, 1978.
- [3] Ito, H. et al.; *J. Bacteriol.*, 153:163—168, 1983.
- [4] Ito, H. et al.; *Agric. Biol. Chem.*, 48(2):341—347, 1984.
- [5] Penttila, M.E. et al.; *Curr. Genet.*, 12:413—420, 1987.
- [6] Kunze, G. et al.; *J. Biotechnol.*, 7:33—48, 1988.
- [7] Maniatis, T. et al.; *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [8] Sherman, F. et al.; *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1986.
- [9] Orr-Weaver, T.L. et al.; *Methods in Enzymology*, Vol 101, edited by Ray. Wu Lawrence Grossman and Kivie Moldave, Academic Press. pp.228—245, 1983.
- [10] Michael, B.; *Biotechniques*, 5(6):516—518, 1987.

A RAPID AND EFFICIENT PROCEDURE FOR TRANSFORMATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* INTACT CELLS WITH PLASMID DNA

Mao Xiaohong Cai Jinke

(Institute of Microbiology, the Chinese Academy of Science, Beijing)

A rapid and efficient yeast transformation procedure has been developed through investigation on factors affecting transformation efficiency. The manipulation of whole procedure can be done within one and half hour. High yield of transformants is obtained by adding calf thymus DNA as carrier DNA; adding PEG4000 and DNA to cell suspension simultaneously; prolonging heat shock from 5' to 25' and spreading the transformation mixture directly onto agar plates after heat shock. The pretreatment of yeast intact cells with LiAc can be omitted. The transformation rates of four types of plasmid DNA were as follows; pCN60; $3.5-7.2 \times 10^4$ (for linear pCN60/BamH I; 1.6×10^5); YEp13; $1.7-2.6 \times 10^4$ (for linear YEp13/BamH I; 8.0×10^4); RC4; 3.7×10^4 ; Y I p5/StuI; 7.6×10^3 . 7 recipient strains transformed by using this procedure all reached the yields of 10 transformants per microgramme DNA.

Key words

Transformation of *S. cerevisiae* intact cells; calf thymus DNA; heat shock; recipient strain; plasmid DNA