# 载体浓度和感受态对大分子载体转化效率的影响

覃鸿妮<sup>1</sup>,张兰兰<sup>2</sup> (1.苏州工业园区服务外包职业学院,江苏苏州 215123;2.金唯智(苏州)生物科技有限公司,江苏苏州 215123)

摘要 [目的]研究载体量和感受态对阳性克隆率的影响。[方法]利用引物拼接 PCR 技术,自行设计26条引物合成一个835 bp 的目的 基因,将该基因与约20 kb 的大分子载体连接构成重组质粒。在1500 ng 目的基因底物量的基础上,设置50、100、150、200、250、300 ng 6 个梯度载体量,得到的重组反应产物再转化入 Top10F'、DH5α、Stbl3、Epi400、JM108、SCSI 6 种不同的感受态中,组成36 个试验组合。 [结果] 不同载体量阳性克隆率由大到小依次为200、250、300、150、100、50 ng,200 ng 的阳性克隆率最高可达75%,平均达28.5%。不同 感受态细胞阳性克隆率由大到小依次为Stbl3、Top10F'、DH5α、JM108、Epi400、SCSI,Stbl3 在任何载体浓度下均高于其他感受态,平均阳 性克隆率为42.4%。[结论]载体量和感受态均明显影响阳性克隆率,最佳组合为200 ng 的载体分子量配合Stbl3 感受态,阳性克隆率 可达75%。

关键词 大分子载体;载体浓度;感受态;转化效率

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)17-181-06

#### Effects of Vector Density and Competent Cells on the Large Vector Transformation Efficiency

QIN Hong-ni<sup>1</sup>, ZHANG Lan-lan<sup>2</sup> (1. Suzhou Industrial Park Institute of Services Outsourcing, Suzhou, Jiangsu 215123; 2. Genewiz (Suzhou) Biotechnology Co., Ltd., Suzhou, Jiangsu 215123)

**Abstract** [Objective] To research the effects of vector quantity and competence on the positive cloning rate. [Method] With a known gene sequence but in the absence of DNA template, we artificially designed 26 primers to synthesize a target gene of 835 bp *in vitro* using overlapping PCR technique. The whole experiment design with two factors and six levels (36 combinations) was applied to study the effects of the vector density and competent cells on the large vector transformation efficiency. Based on the 1 500 ng target gene, the vector density grades were designed (50, 100, 150, 200, 250, 300 ng), and then the recombinant plasmids were transformed into Top10F', DH5 $\alpha$ , Stbl3, Epi400, JM108, SCSI. [Result] The positive cloning rates of different vector amounts from big to small were in the order of 200, 250, 300, 150, 100 and 50 ng. The maximum positive cloning rate of 200 ng reached 75%; and the average value was 28.5%. The positive cloning rates of different competent cells from big to small were in the order of stbl3, Top10F', DH5 $\alpha$ , JM108, Epi400 and SCSI. Stbl3 was higher than other competent cells under any vector density. And its average positive cloning rate was 42.4%. [Conclusion] Both the vector density and competent cells have significant effects on the large vector transformation efficiency. The optimal combination is C4 with 200 ng vector density and Stbl3, the positive cloning rate of which could reach 75%.

Key words Macromolecular vector; Vector density; Competent cells; Transformation efficiency

质粒载体是细胞中具有自主复制能力的较小 DNA 分子, 是基因工程中重组 DNA 最常见的运载体,可以将目的 DNA 片 段通过重组 DNA 技术,导入受体细胞中进行繁殖和表达<sup>[1-7]</sup>。 质粒载体的 DNA 长度从数千碱基对到数十万碱基对不等,相 对于分子量较小的载体,大分子载体在细胞外的重组连接效率 低,在感受态中转化效率低,在宿主细胞内的拷贝率低,传代易 产生目的 DNA 的随机突变和缺失,表达很不稳定<sup>[8-10]</sup>。因此 需要有一个优化的重组连接体系和一个优化的感受态转化体 系,提高大分子载体的重组效率和转化效率<sup>[11-13]</sup>。

笔者利用引物拼接 PCR(Polymerase Chain Reaction)技术,自行设计 26 条引物合成一个 835 bp 的目的基因,将该基因与约 20 kb 的大分子载体 pCMV5 连接构成重组质粒。在1 500 ng 目的基因底物量的基础上,以 50、100、150、200、250、300 ng 进行 6 个梯度载体量的重组反应,得到的重组反应产物再转化入 Top10F'、DH5α、Stbl3、Epi400、JM108、SCSI 6 种不同感受态中,交叉组成 36 种不同的组合,分别对这 36 种组合所得到的阳性克隆率进行分析,以期得到针对大分子载体进行重组克隆的最优载体量和最佳感受态。

### 1 材料与方法

# 1.1 试验材料

基金项目 苏州工业园区服务外包职业学院教研教改研究课题(JG-201601)。 作者简介 覃鸿妮(1983-),女,湖北长阳人,讲师,博士,从事分子生

收稿日期 2016-05-06

1.1.1 目的基因。选定一个长 835 bp 的目的基因(图1),整体 GC 含量为 56.17%,非高 GC 含量基因,且 GC 含量波动较小,总体较易扩增(图2)。目的基因无明显正向重复,无明显反向重复,无明显自身重复,引物设计无难度,PCR 扩增较易。
1.1.2 目标载体。目标载体为经人工改造的 pCMV5 载体,人工加入 AMP 抗性,载体总长 19 043 bp,属于大分子质粒载体(图3)。

# 1.2 试验方法

1.2.1 目的基因的合成。根据基因序列委托相关公司设计 和合成 PCR 扩增所需的 26 条引物(表 1),将引物稀释到 20 pmol/μL,每条引物取 2 μL 混匀作为引物混液,通过 2 轮 PCR 合成目的基因。

**1.2.2** 不同载体量设置。取36个分别装有10μL 重组酶的PCR 管,分成A、B、C、D、E、F6组,每组6个,分别编号A1~A6,B1~ B6,C1~C6,D1~D6,E1~E6,F1~F6,并按表2(以A组为例)加 入不同的载体量。PCR 仪50℃反应1h,-20℃保存。

**1.2.3** 不同感受态设置。Top10F'感受态包括 A1 ~ A6, DH5α 感受态包括 B1 ~ B5, Stb13 感受态包括 C1 ~ C6, Epi400 感受态包括 D1 ~ D6, JM108 感受态包括 E1 ~ E6, SCSI 感受态包括 F1 ~ F6。

1.2.4 菌检结果判定。36个平板,每个平板挑选24个斑进 行电泳检测,由于电泳样品太多,在结果中不直接显示电泳 图,而是统计出每24个克隆中阳性克隆的个数除以24,得到 阳性克隆率。菌检产物阳性克隆的判断方法:将电泳条带与 Ladder 比对,1 149 bp 即阳性克隆记为 1,412 bp 即空载体记

bp 即空载体记 为0,引物二聚体即该菌液样品是杂斑生长记为0。

图1 目的基因全序列

Fig. 1 Sequence of objective gene



图 2 目的基因 GC 含量





### 图3 目标载体结构



表1 引物序列 Table 1 Primer sequence

序号 Code	序列 Sequence (5'-3')	碱基数 Base number
1	GGGGCTGCTGACCTGGCTCATGTCCATCGATGTCAAGTACCAGATCTGGAAG	52
2	GAACGAGTTGTCCGTGAAGATGACCCCCGAACTTCCAGATCTGGTACTTGACATC	54
3	TCTTCACGGACAACTCGTTCCTGTACCTGGGCTGGTACATGGTGATGTCC	50
4	CGGCAAAGAAGAAGTTGTTGTAGTGGCCCAGGAGGGACATCACCATGTACCAGC	54
5	CAACAACTTCTTCTTTGCCGCCCACCTGCTGGACATCGCCATGGGGGTCAAGA	53
6	TTGTGGGTGACAGAGGAGGAGGATGGTACGCAGCGTCTTGACCCCCATGGC	50
7	CTCTCCTCTGTCACCCACAATGGGAAACAGCTGGTGATGACTGTGGGCCTCCT	53
8	AAGGCCACCACAGTGTACAGGTAGACCACGACGGCCAGGAGGCCCACAGTCATC	54
9	CTGTACACTGTGGTGGCCTTCAACTTCTTCCGCAAGTTCTACAACAAGAGCGA	53
10	GCACTTCATGTCCGGCTCGTCCTCGTCCTCGCTCTTGTTGTAGAACTTGC	50
11	AGCCGGACATGAAGTGCGATGACATGATGACGTGCTACCTGTTCCACATGTACGT	55
12	TCGTCCCCGATGCCTCCGCCAGCCCGGACGCCCACGTACATGTGGAACAGGTAGC	55
13	GGCATCGGGGACGAGATCGAGGACCCAGCGGGCGATGAATACGAGCTCTAC	51
14	AAGAAGAAGGTGATGTCGAAGACCACCCGGTAGAGCTCGTATTCATCGCC	50
15	GTCTTCGACATCACCTTCTTCTTCGTCATTGTCATCCTGCTGGCCATC	51
16	GGAGCTCGCCGAAGGCGGCGATAATCAGACCCTGGATGATGGCCAGCAGGATGA	54
17	CCTTCGGCGAGCTCCGAGACCAGCAGGAGCAAGTGAAGGAAG	50
18	CTGCCAATCCCGCAGATGAAGCATTTGGTCTCCATATCTTCCTTC	52
19	CTGCGGGATTGGCAGTGACTACTTCGATACCACGCCGCACGGCTTCGAGACCC	53
20	CATGTAATTGGCCAGATTGTGCTCCTCTAGCGTGTGGGTCTCGAAGCCGTG	51
21	CACAATCTGGCCAATTACATGTTCTTCTTGATGTATCTGATAAACAAGGAC	51
22	ACTCCTGGCCCGTGTGCTCCGTCTCGTCCTTGTTTATCAGATACATCAAGAA	52
23	CACACGGGCCAGGAGTCCTACGTCTGGAAGATGTATCAGGAGAGGTGCTGGG	52
24	ACTGCTTGCGGAAGCAGTCGCCGGCGGGGAAGAAGTCCCAGCACCTCTCCTGATA	55
25	CTGCTTCCGCAAGCAGTACGAGGACCAGCTGAGCTGAGAAGCTTGCATGCCTGCA	55
26	GTCACAGGGATGCCACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT	55

1.0

表 2	连接体系
hla 🤉	Ligation system

	Table	2 Ligation s	ystem	μι	L
编号 Code	<u>重</u> 组酶 Recombinase	DNA001 1 500 ng∕µL	载体 Vector 50 ng/µL	$\rm ddH_2O$	
1	10	1	1	8	
2	10	1	2	7	
3	10	1	3	6	
4	10	1	4	5	
5	10	1	5	4	
6	10	1	6	3	

# 2 结果与分析

**2.1 目的基因的合成** 由图 4 可知,目的基因的 PCR 产物 在 750~1 000 bp,与其理论值大小 855 bp 相符。



# 图 4 PCR 产物电泳图 Fig. 4 Electrophoretogram of PCR products

**2.2 载体线性化** 由图 5 可知,酶切后理论大小为 19 043 和 98 bp,由于 5 000 Ladder 最小值为 100 bp,因此,98 bp 在 图中无法显示,酶切结果与理论值相符。

2.3 转化后菌落生长情况 在6种感受态中,A1~F6共36



注:1、2、3 分别为5 000 bp Ladder、酶切样品、10 kb Ladder。

Note:1,2,3 bands were 5 000 bp Ladder, enzyme digestion sample and 10 kb Ladder, respectively.

### 图 5 载体酶切电泳图

# Fig. 5 Electrophoretogram of restriction enzyme digestion products

个平板,分别为加入载体量50、100、150、200、250、300 ng的菌 落生长情况。由图6~10可知,36个平板菌落均生长良好。

2.4 菌检阳性克隆率 由表4和图12可知,不同载体浓度对 大分子载体的阳性克隆率有明显影响,平均阳性克隆率由大到 小依次为200、250、300、150、100、50 ng,在所有感受态中,200 ng 的阳性克隆率均最大,最高可达75%,平均达28.5%。载体浓 度低于100 ng转化效率不到10%。

不同感受态对大分子载体的阳性克隆率有明显影响,平均阳性克隆率由大到小依次为 Stbl3、Top10F'、DH5α、JM108、 Epi400、SCSI,最好的感受态是 Stbl3,在任何载体浓度下均高于其他感受态,平均阳性克隆率为 42.4%。JM108、Epi400、 SCSI 3 种感受态的平均阳性克隆率均低于 10%。





图 7 DH5α感受态菌落生长情况 Fig. 7 The growth of colonies cultured in DH5α



图 8 Stbl3 感受态菌落生长情况 Fig. 8 The growth of colonies cultured in Stbl3

表 4 阳性克隆率							
Table 4         Positive rate of cloning						%	
浓度 Concen- ration//ng	A (Top 10F')	$\begin{array}{c} B \\ (\mathrm{DH} \\ 5\alpha ) \end{array}$	C (Stbl3)	D (Epi 400)	E (JM 108)	F (SCSI)	平均 Meam
50	0	0	4.2	0	0	0	0.7
100	4.2	4.2	12.5	0	4.2	0	4.2
150	8.3	12.5	41.7	4.2	8.3	4.2	13.2
200	33.3	29.2	75.0	8.3	16.7	8.3	28.5
250	29.2	20.8	66.7	4.2	8.3	4.2	22.2
300	20.8	12.5	58.3	0	4.2	4.2	16.7
平均	16.0	13.2	42.4	2.8	6.9	3.5	

# 3 讨论

对于一般的重组试验,载体加样量远低于 200 ng,以最

为普通的 puc57 系列载体为例,重组反应的载体加样量仅 30 ng左右<sup>[1,3-4]</sup>。这就导致实验室在遇到较大的载体时,阳 性克隆率低甚至为0 的现象。不同感受态由于基因型的不 同,对不同大小、不同类型质粒的拷贝率相差较大<sup>[14-18]</sup>。该 研究选用的载体接近 20 kb,较常用的3~4 kb 的载体更有克 隆难度。大分子载体由于具有重组效率低、转化效率低、拷 贝率低、表达不稳定、不易提取、分离纯化困难等特点<sup>[8-10]</sup>, 国内很多 DNA 服务公司都不愿意接受大分子载体的克隆, 即使有相应的服务,由于失败率高,试验成本高,服务相应的 价格也很高。该研究以约 20kb 的载体为例,选取 6 个梯度 的载体量和 6 种不同的感受态进行试验,结果表明,载体量



图 9 Epi400 感受态菌落生长情况 Fig. 9 The growth of colonies cultured in Epi400



图 10 JM108 感受态菌落生长情况

# Fig. 10 The growth of colonies cultured in JM108

和感受态对阳性克隆率均有很大影响,并得到了最优组合, 为提高大分子载体的克隆效率提供参考和借鉴。

## 4 结论

该研究针对约20 kb的大分子载体,在1500 ng 目的基因 底物量的基础上,设置50、100、150、200、250、300 ng 6 个梯度载 体量,得到的重组反应产物再转化入 Top10F'、DH5α、Stbl3、 Epi400、JM108、SCSI 6 种不同感受态中,组成36 个试验组合。 结果表明,载体量和感受态均明显影响阳性克隆率。

当反应体系中的载体量过低时,重组反应无法得到足够 多的阳性克隆,筛选效率很低。当反应体系的载体量过高 时,挑斑筛选时又会筛选到较多的空载体,影响阳性克隆率。 针对 20 kb 左右的载体,载体的分子量在 200 ng 左右阳性克 隆率最高。相对于其他感受态, Stbl3 对于大载体的拷贝能 力远高于其他感受态。最佳组合为 200 ng 的载体分子量配 合 Stbl3 感受态, 阳性克隆率可达 75.0%。

## 参考文献

- [1] 钟星,翟超,陈亮,等. 构建定向 T 载体用于基因克隆和表达[J]. 生物 工程学报,2013,29(4):510-519.
- [2] 于洋,蒋世翠,王康宇,等.大片段 DNA 克隆载体的研究进展[J]. 黑龙 江农业科学,2015(2):147-151.
- [3] 吴亚锋,梁东春,郭刚,等. pUC-T 载体的构建[J]. 天津医药,2005,33 (3):159-160.
- [4] 李江,张俊芳,甄园丽,等. pCMV-Myc-PIASxβ 重组质粒的构建与蛋白 表达[J]. 吉林大学学报(医学版),2009,35(3):415-418.
- [5] 严飞,赵新宇,邓洪新,等. 一种新的双元表达质粒 pCMV-Myc-IRES-EGFP 的构建及其表达[J]. 生物工程学报,2007,23(3):423-428.
- [6] 王洪振,周晓馥,宋朝霞,等.简并 PCR 技术及其在基因克隆中的应用



图 11 Scsi 感受态菌落生长情况 Fig. 11 The growth of colonies cultured in Scsi

- [J]. 遗传,2003,25(2):201-204.
- [7] 郑宝强,王雁,彭镇华,等.卡特兰 ACO 基因克隆与反义表达载体的构 建[J].核农学报,2009,23(3):442-446.
- [8] 王弘,吴梧桐,顾学裘. 脂质体作为生物大分子载体的研究进展[J]. 药物生物技术,2002,9(3):171-174.
- [9] 谭德勇,邓双胜,孟玲,等. 改善大分子质粒 DNA 重组效率的新方法
- [J]. 生物化学与生物物理进展,1997,24(3):281-283.
- [10] 樊颖伦,赵开军.大片段克隆载体研究进展[J].中国生物工程杂志, 2004,24(3):12-16.
- [11] LIU L,LIU Y G,XU X P,et al. Efficient linking and transfer of multiple genes bu a multigene assembly and transformation vector system [J]. PNAS,2003,100(10);5962-5967.
- [12] SHIZUYA H, KOUROS-MEHR H. The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system [J]. Keio journal of

# (上接第176页)



注:M. Marker;1. 普通小麦;2. 黑麦。

Note: M. Marker 1. Common wheat; 2. Rye.

图1 引物 Xgwm 335 SSR 扩增结果

Fig. 1 SSR amplification results of primer Xgwm 335

#### medicine,2001,50(1);26-30.

- [13] 张飞飞,石牡丹,尚广东.基于重组工程法高效转化效率的大肠杆菌 Bl21(DE3)表达菌株构建[J]. 安徽农业科学,2015,43(20):29-31,72.
- [14] 张岚岚,徐春燕,徐昌杰.大肠杆菌感受态细胞转化能力的影响因素 [J].中国细胞生物学学报,2004,26(4):429-432.
- [15] 杨坤,巩振辉,李大伟.大肠杆菌高效感受态细胞的制备及快捷转化 体系的建立[J].北方园艺,2010(14):127-130.
- [16] 代军.大肠杆菌感受态细胞制备及转化条件优化[J].江苏农业科学, 2015,43(4):53-54.
- [17] 杨坤. E. coli 高效感受态细胞转化体系的建立及诱导型瞬时表达载体的构建[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010:1-48.
- [18] 涂知明,陈明洁,何光源,等. 三种大肠杆菌高效感受态的制备及转化 [J]. 华中科技大学学报(自然科学版),2006,34(4):112-115.

# 3 结论

位于黑麦基因组的 SCM 2、SCM 109、SCM 180、SCM 304、 SCM 101、SCM 120、SCM138、SCM 268 引物,可用于鉴定小麦 遗传条件下的黑麦遗传成分。目前所开发出来的黑麦特异引 物还很少,对于鉴定小麦遗传条件下的黑麦遗传成分有一定限 制。小麦 ABD 组染色体上也含有该试验所使用的 Xgwm 编号 引物,且该引物最初是开发定位在小麦微卫星图谱上的,普通 小麦和黑麦之间使用 Xgwm 引物扩增出的产物有差异,这表明 理论上也可用于鉴定小麦遗传条件下的黑麦遗传成分。

### 参考文献

- [1]张晓祥,王玲,寿路路,等. 一种快速提取小麦基因组 DNA 的改良 CTAB 方法[J]. 中国农学通报,2012,28(36):46-49.
- [2] 李莉,王俊峰,颜廷进.基于 SSR 标记的山东省小麦 DNA 指纹图谱的 构建[J].植物遗传资源学报,2013,14(3):537-541.
- [3] 丁海燕,邢璐璐,张海涛,等. 小麦 黑麦易位系的研究[J]. 植物研究, 2009(1):22-24.
- [4] SAAL B, WRICKE G. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.) [J]. Genome, 1999, 42: 964 – 972.
- [5] KHLESTKINA E K,MA HLA MYINT THAN,PESTSOVA E G, et al. Mapping of 99 new microsatellite – derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequence tags[J]. Theor Appl Genet, 2004,109:725 –732.
- [6] 丁海燕,郑茂波,徐英博,等. 一个大穗型小麦 黑麦异代换系的细胞 学和 SSR 鉴定[J]. 麦类作物学报,2008(2):51-54.