第 17 卷 无 锡 轻 工 大 学 学 报 Vol. 17
第 3 期 JOURNAL OF WUXI UNIVERSITY OF LIGHT INDUSTRY 1998 No. 3

酵母细胞的高效转化方法

王正祥 方慧英 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 运用醋酸锂处理酵母细胞, 建立并优化了酵母完整细胞的高效质粒转化体系, 转化率达 $10^4\ \mu g^{-1}$. 通过对影响转化的诸因子的研究, 发现载运 DNA 是影响酵母完整细胞转化效率的最主要因素, 热休克处理及处理时间、聚乙二醇相对分子质量及浓度等对转化率也有显著影响。

关键词 酵母细胞; 质粒; 转化; 脱氧核糖核酸

分类号 TS261.11/Q785

0 前 言

转化是酵母基因操作技术中的重要步骤之一。由于酵母细胞不象大肠杆菌和枯草芽胞杆菌等原核微生物那样具有可以将外源 DNA 或基因摄入细胞内的特殊生理状态(即感受态), 因此, 酵母细胞的转化曾是酵母基因工程的一大限制因素。微生物原生质体技术的发展与应用, 使酵母细胞的质粒/DNA 转化技术有了突破, 随着原生质体技术在工业微生物育种中的应用, 1978 年 Hinnen 等[1]和 Beggs[2] 首次报道了应用原生质体转化技术将质粒 DNA 成功地转化入酿酒酵母且转化率可达 10^3～$10^4\ \mu g^{-1}$. 该法曾为酵母基因工程的发展起过重要作用。但该法的缺点也十分明显, 一方面酵母的原生质体制备与再生需要较长的时间和较复杂的步骤, 另一方面酵母细胞间的融合和单倍体化有时会影响对转化子遗传和生理生化检测; 再则, 酵母原生质体转化有时会因原生质体形成率低或再生率低而直接大幅度降低转化效率。因而, 本法的转化重复性不十分理想。Ito 等[3]不久提出了另一种酵母细胞转化法, 即完整细胞转化法, 运用单价离子对酵母细胞进行诱导后可使酵母细胞摄入外源 DNA 而实现质粒 DNA 的转化, 其最大优点是不需要制备原生质体, 但转化率较低是其缺陷。此后, 不少研究者对这一转化法进行改进, 包括载运 DNA 的添加, 聚乙二醇(PEG) 的使用, 热休克处理等, 使这一转化方法的转化率提高到 $10^4\ \mu g^{-1}$. 作者在 Ito 等[3,4]研究方法的基础上对完整细胞转化法进行改进, 研究了影响酵母细胞转化效率的数个要素, 建立了适合于各种酵母及其质粒载体的高效转化方法。

国家"九五"科技攻关项目
收稿日期: 1997-12-19
第一作者: 王正祥, 男, 1964 年 3 月生, 博士生, 副教授
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://

1 材料与方法

1.1 试剂与试液

0.1 mol/L 的 LiAc 溶液: LiAc(上海试剂二厂产品) 用超纯水配成 0.1 mol/L 的溶液, 高压灭菌。350 g/L 的 PEG 溶液: PEG4000(BIB 公司产品) 溶于 0.1 mol/L 的 LiAc 溶液中, 高压灭菌。PEG1000 为 Baker 公司产品, PEG6000 为 BIB 公司产品。

表 1 实验用菌株和质粒

菌株及质粒	来 源
酿酒酵母 Y17	李育阳教授赠
酿酒酵母 W303	Hohmann 博士赠
酿酒酵母 642	Hohmann 博士赠
酿酒酵母 392	Hohmann 博士赠
YEp51	李育阳教授赠
YEpLac195	Hohmann 博士赠
YEpGPD1	Hohmann 博士赠[5]
pDB248	Mizuno 博士赠[6]

1.2 菌株与质粒

研究中使用的菌株和质粒列于表 1.

1.3 DNA 制备

质粒 DNA 制备: 按文献[7] 用碱裂解法进行提取, 并用 PEG 法进行纯化。

载运 DNA 的制备: 将小牛胸腺 DNA 溶液用超声波破碎仪于 300 W 超声破碎 30 s, 制备片面积在 1～2 kb 的 DNA 片段, 终质量浓度为 10 g/L.

1.4 酵母细胞的转化[3,4]

取一环活化的酵母细胞接入 50 mL 液体酵母完全培养基(YEPD) 中, 于 30 ℃, 250 r/min 振荡培养至对数生长期, 10 000 r/min 离心 5 s 收获细胞, 用 10 mL 0.1 mol/L 的 LiAc 溶液离心洗涤一次, 再用 2 mL 0.1mol/L 的 LiAc 溶液悬浮菌体, 于 30 ℃, 80 r/min 振荡孵育 1 h. 取 0.2 mL 细胞悬液装入 1.5 mL 的塑料离心管中, 加入 10 μg 载运 DNA 和 0.1～1 μg 质粒 DNA, 振荡混匀后于 30 ℃孵育 30 min, 再加入 1.2 mL PEG 溶液, 振荡混匀后于 30 ℃继续孵育 1 h. 42 ℃水浴中孵育 15 min. 离心收获细胞, 用无菌水离心洗涤一次, 菌体用 0.2 mL 无菌水悬浮后涂布选择性培养基。30 ℃培养 2～3 d 后检测转化子。

2 结果与讨论

2.1 PEG 相对分子质量及其质量浓度对转化效率的影响

选用不同相对分子质量及不同质量浓度的 PEG 做转化试验, 结果见表 2. 可以看出, 不同相对分子质量及不同质量浓度的 PEG 下酵母细胞的转化有显著差异, 以 350 g/L 的 PEG4000 最佳。试验中还发现, 不同厂家生产的甚至同一厂家不同批号的 PEG 对酵母细胞的质粒转化率也有明显影响。因此, 在进行酵母细胞质粒转化之前通过预试验选择某个生产厂家某个批号的 PEG 是十分重要的。

表 2 PEG 对转化效率的影响

PEG 种类	PEG 质量浓度/(g/L)	转化率*
PEG1000	200	120
	300	387
	350	402
	400	455
	500	89
PEG4000	200	864
	300	8100
	350	12000
	400	9200
	500	2100
PEG6000	200	690
	300	6600
	350	7800
	400	7200
	500	2300

注: 受体菌为 W303, 质粒为 YEpLac195

2.2 载运 DNA 对转化效率的影响

在进行酵母细胞质粒转化中加入不同浓度的载运 DNA, 测定不同浓度载运 DNA 对转化率的影响。结果见图 1. 可见, 载运 DNA 对酵母细胞的质粒转化效率有显著的影响。随着载运 DNA 加入量的增加, 酵母细胞转化效率显著提高, 当载运 DNA 加入量达到 16 μg 时

© 1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://

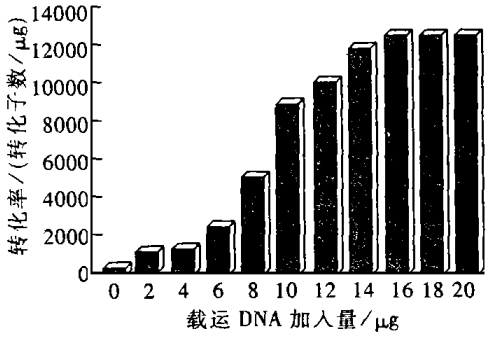


图 1　载运 DNA 加入量对转化率的影响

转化效率达到最高,比不加载运 DNA 时的转化率提高约 150 倍。载运 DNA 在酵母完整细胞转化中的作用一般认为是载运 DNA 分子可以保护质粒分子免受 DNA 酶降解的作用,因此使能有效进入细胞的质粒分子数目增加,转化率升高。如果仅仅是这样,只要提高质粒的添加量就可以有效地提高转化率。作者在试验中曾在不加载运 DNA 的转化体系中通过提高质粒 DNA 的浓度来考察酵母细胞转化率,结果并不十分理想。因此,作者认为载运 DNA 在酵母细胞转化中除了上述作用外,还有可能在酵母细胞摄取外源 DNA 能力的诱导和维持以及在协助质粒 DNA 进入细胞内时发挥重要作用。

2.3　热休克时间对转化效率的影响

酵母细胞与质粒 DNA 一起孵育后于 42℃下热休克不同时间,考察其对酵母细胞转化效率的影响,结果显示,42℃热休克是酵母细胞高效转化不可缺少的一步,延长热休克时间可明显提高酵母细胞的转化效率(图 2)。研究中同时发现无 PEG 存在时的热休克会急剧降低转化效率,这与裂殖酵母完整细胞转化的结果一致[8]。而 Ito 等[3]在最初的研究报告中认为,42 ℃热休克对转化效率影响不大,可以省略。但 Ito 等[3]的反应体系中无载运 DNA,这可能是与本研究结果不同的主要原因之一。

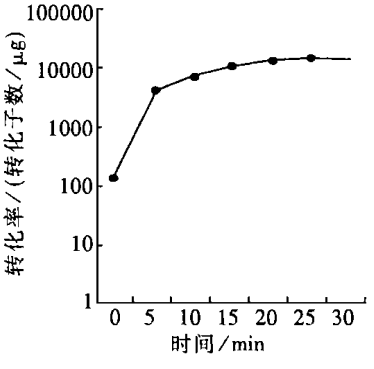


图 2　热休克时间对转化效率的影响

2.4　细胞生长时间对转化效率的影响

将处于不同生长阶段的酵母细胞用离心收获,调整细胞至 10^8 作转化试验,测定转化效率,结果显示,酵母细胞培养时间在 12～22 h 之间对其转化效率无显著差异。见图 3.

2.5　贮存条件对转化效率的影响

将经 LiAc 溶液处理的酵母细胞于 4 ℃放置不同时间后作转化试验,结果显示酵母细胞的转化效率随放置时间的延长而降低。见图 4.

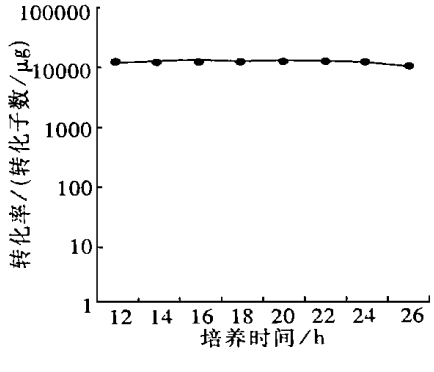


图 3　细胞生长时间对转化率的影响

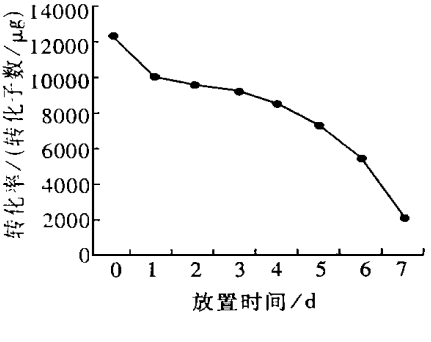


图 4　放置时间对转化率的影响

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://

2.6 高效转化法

在上述试验结果的基础上,作者建立了如下高效转化方法。运用此方法对6株受体菌和4种质粒进行了10多次转化试验,转化率皆稳定维持在10^4以上。并且,该方法可在1.5 mL的离心管中微量进行。

高效酵母细胞转化步骤为:取1 mL酵母细胞培养液,10 000 r/min离心5 s收获细胞→用1 mL 0.1 mol/L的LiAc溶液离心洗涤1次→细胞沉积用0.2 mL浓度为0.1 mol/L的LiAc溶液悬浮→30 ℃,80 r/min振荡孵育1 h→加入10 μg载运DNA→加入0.1～1 μg质粒DNA→振荡混匀后于30 ℃孵育30 min→加入1.2 mL PEG溶液→振荡混匀后于30 ℃孵育1 h→42 ℃水浴中孵育20 min→离心收获细胞,用无菌水离心洗涤1次→菌体用0.2 mL无菌水悬浮后涂布选择性培养基→30℃培养2～3 d后检测转化子。

参 考 文 献

1 Hinnen A, Hicks J B, Fink G R. Transformation of yeast. Proc Natl Acad Sci USA. 1978, 75: 1929～1933

2 Beggs J D. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature. 1978, 275: 104～109

3 Ito H, Fukuda Y, Murata K, et al. Transformantion of intact yeast cells treated with alkali cations. J Bacteriol. 1983, 153: 163～168

4 Ito H, Murata K and Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations or thiol compounds. Agric Biol Chem. 1984, 48: 341～347

5 Albertyn J, Hohmann S, Thevelein J M, et al. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenease, is essential for growth under osmotic stress in Saccharomyces cerevisiae, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. Mol Cell Biol. 1994, 14: 4135～4144

6 Ohmiya R, Yamada H, Nakashima K, et al. Osmoregulation of fission yeast: cloning of two distinct genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrigenase, one of which is responsible for osmotolerance for growth. Mol Microbiol. 1995, 18: 963～973

7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Mol Cloning: A Lab Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

8 Beach D, Nurse P. High-frequency transformation of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Nature. 1981, 290: 140～142

A High Efficiency Method for Transformation of Intact Yeast Cells

Wang Zhengxiang Fang Huiying Zhuge Jian

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi214036)

Abstract A method with the efficiency of 10^4 per microgram of plasmid DNA for transformation of intact yeast cells with yeast-*E. coli* shuttle vectors was established by treating intact cells with lithium acetate. The presence and the concentration of cassier DNA were found to be the key factors affecting the transformation efficiency. The molecular weight and concentration of polyethylene glycerol, as well as the heat shock also affect the transformation efficiency remarkably.

Key words yeast cells; plasmid; transformation; DNA

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://

(责任编辑:秦和平)