

质粒转化操作手册

常用转化方式有热激法和电转化法，下面以大肠杆菌为例，分别简述两种方法操作步骤。

热激法转化

实验试剂及仪器

DH5 α 感受态细胞，LB 液体培养基，移液枪，离心管，无菌培养皿，恒温水浴锅，离心机，超净工作台等。

操作方法

- 1) 从-80 °C冰箱中取 100 μ L 感受态细胞悬液，置于冰上融化；
- 2) 加入 20 ng 质粒 DNA（体积不超过 5 μ L），轻轻摇匀，冰上放置 30 分钟；
- 3) 42 °C 水浴中热击 60- 90 sec，热激过程中不要移动离心管，热激后迅速置于冰上冷却 3~5 min；
- 4) 向管中加入 1 mL LB 液体培养基（不含抗生素），吸打混匀后于 37 °C，220 rpm 摇床振荡培养 1 小时，使细菌恢复正常生长状态，并表达质粒编码的抗生素抗性基因；
- 5) 将上述菌液摇匀后，离心，去除 900 μ L 上清，余下培养基吸打混匀后取 100 μ L 涂布于含抗生素的筛选平板上；
- 6) 平板正面向上放置半小时，待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿，37 °C 培养 16-24 hrs。

注意事项

- 1) 质粒 DNA 的质量和浓度：用于转化的质粒 DNA 应主要是超螺旋态的，一般来说，DNA 溶液的体积不应超过感受态细胞体积的 5%；防止杂菌和杂 DNA 的污染；
- 2) 整个操作过程均应在无菌条件下进行，所用器皿，如离心管，移液枪头等最好是新的，并经高压灭菌处理。所有的试剂都要灭菌，且注意防止被其他试剂、DNA 酶或杂 DNA 所污染，否则均会影响转化效率或杂 DNA 的转入；
- 3) 整个操作均需在冰上进行，不能离开冰浴，否则细胞转化率将会降低；
- 4) 热激的时间不宜过长或过短，动作轻柔。

电转化

连接产物纯化

- 1) 将连接产物转移至 1.5 mL Eppendorf 管中，加入 10 μ L 的 ddH₂O、2 μ L 的 3M NaAC（pH 5.2）和 50 μ L 无水乙醇；轻轻混匀，稍微离心并将其置于-20 °C 放置 1 hrs 以上；

- 2) 4 °C下 top Speed 离心 30 min; 小心移去上清, 避免接触到管底的沉淀物;
- 3) 加入 500 μL 的 70 % 乙醇, 轻轻颠倒几次洗涤沉淀 (注: 不要离心混匀);
- 4) 4 °C下 top Speed 离心 5 min; 小心移去上清, 将此 Eppendorf 管置空气中直至无乙醇气味;
- 5) 加入 10 μL 的 ddH₂O 重新溶解沉淀, 4 °C短期保存, -20 °C长期保存备用。

电转化

- 1) 从-80 °C冰箱中取出感受态细胞, 置于冰上解冻;
- 2) 取 1 μL 纯化后的质粒于一个 1.5 mL 的离心管中, 将其和 0.1 cm 的电极杯一起置于冰上预冷;
- 3) 将 40-100 μL 解冻的感受态细胞转移至此 1.5 mL 的离心管中, 小心混匀, 冰上放置 10 min;
- 4) 打开电转仪, 调至 Manual, 调节电压为 2.1 KV;
- 5) 将此混合物转移至已预冷的电极杯中, 轻轻敲击电极杯使混合物均匀进入电极杯的底部;
- 6) 将电极杯推入电转化仪, 按一下 pulse 键, 听到蜂鸣声后, 向电击杯中迅速加入 1000 μL 的 SOC 液体培养基, 重悬细胞后, 转移到 1.5 mL 的离心管中;
- 7) 37 °C, 220—250 rpm 复苏 1 hrs;
- 8) 取 20 μL 转化产物涂板, 放于 37 °C温室, 过夜培养, 次日查看转化结果。其余菌液加 1: 1 的 30 %的甘油后混匀-80 °C保存。

注: 每块加有 Amp 的平板上均匀涂有 X-Gal 80 μL , SOC 80 μL , IPTG 20 μL 。

电击杯的清洗

- 1) 用清水将电击杯稍冲一下;
- 2) 向电击杯中加入的 75%酒精浸泡 2 hrs;
- 3) 弃去酒精, 再用蒸馏水冲洗 2~3 遍, 然后用 1 mL 的枪吸取超纯水反复吹打电击杯 10 遍以上;
- 4) 加入无水乙醇 2 mL 于电击杯中, 浸泡 30 min;
- 5) 弃去无水乙醇, 于通风橱内挥干乙醇;
- 6) 将清洗好的电击杯放入-20 °C冰箱内待用。

注: 不同样品使用的电机杯应分开。