

质粒转化实验方案

转化 (Transformation) 是将外源 DNA 分子引入受体细胞, 使之获得新的遗传性状的一种手段, 它是微生物遗传、分子遗传、基因工程等研究领域的基本实验技术。转化过程所用的受体细胞一般是限制修饰系统缺陷的变异株, 即不含限制性内切酶和甲基化酶的突变体 (R-,M-), 它可以容忍外源 DNA 分子进入体内并稳定地遗传给后代。受体细胞经过一些特殊方法 (如电击法, CaCl₂, RbCl(KCl) 等化学试剂法) 的处理后, 细胞膜的通透性发生了暂时性的改变, 成为能允许外源 DNA 分子进入的感受态细胞 (Competent cells)。

质粒可以在 -20℃ 长期保存。商品化的质粒每管包括 2ug 质粒, 溶解在 20ul TE buffer 中。使用 10ng 质粒转化感受态细胞, 即可获得较好的转化效果。

实验例: pEGFP-N1 质粒转化 DH5α 感受态细胞

1. 将含有 DH5α 感受态 (100ul/支) 的离心管从 -80℃ 取出, 放冰上融化。
2. 向离心管中加入 10ng pEGFP-N1 质粒。

备注: 质粒浓度约 100ng/ul。取 1ul 质粒, 用灭菌水稀释到 10ul。

3. 吹打混匀, 放冰浴 30 分钟。
4. 将离心管从冰浴取出, 放入 42℃ 水浴, 90s。然后冰浴 2min。
5. 向离心管中加入 900ul LB 培养基, 37℃ 震荡培养 40min-1h。
6. 取 200ul 培养物, 在酒精灯旁边进行无菌操作, 涂相应的抗性或者选择平板。

备注: 培养基中添加的抗生素与质粒所带的抗生素抗性基因一致。例如 pEGFP-N1 质粒带有卡那抗性, LB 平板需预先添加卡那霉素。

7. 将铺好的平板放入 37℃ 培养箱中培养过夜 (12h-16h)。
8. 次日可获得转化好的 DH5α-pEGFP-N1 菌株。挑取单克隆进行后继实验。