

实验七

转化

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

实验目的



- 1、掌握 CaCl_2 的热激法原理
- 2、熟悉转化的实验技术与方法
- 3、了解转化效率影响因素



转化、转染、转导、感染的概念

转化 (transformation):

是将质粒DNA或以质粒DNA为载体的重组子转入细菌细胞的过程。

转染(transfection)

指外源DNA导入真核细胞而获得新的遗传标志的过程。常规转染技术可分为瞬时转染和稳定转染（永久转染）两大类

转导 (transduction)

由噬菌体将一个细胞的基因传递给另一细胞的过程。它是细菌之间传递遗传物质的方式之一。

感染 (infection)

病原微生物侵入机体导致的病理过程

转化方法

1、化学的方法(热击法): 使用化学试剂(如 CaCl_2) 制备的感受态细胞, 通过**热击**处理将载体DNA分子导入受体细胞, 转化效率 10^6 - 10^7 /ug质粒

2、电转化法: 使用低盐缓冲液或水洗制备的感受态细胞, 通过**高压脉冲**的作用将载体DNA分子导入受体细胞, 转化效率 10^9 - 10^{10} /ug质粒。

重组质粒的转化和克隆的筛选与鉴定

感受态细胞(competent cells):

受体细胞经过一些特殊的方法（如 CaCl_2 、 RuCl 等化学试剂法）的处理后，细胞膜的通透性发生变化，成为能容外源DNA的载体分子通过的感受态细胞(competent cell)。

大肠杆菌感受态制备原理

目前，感受态细胞的制备常用冰预冷的 CaCl_2 处理细菌的方法制备，即用低渗 CaCl_2 溶液在低温（ 0°C ）时处理快速生长的细菌，从而获得感受态细菌。此时细菌膨胀成球形，外源DNA分子在此条件下易形成抗DNA酶的羟基—钙磷酸复合物粘附在细菌表面，通过热激作用促进细胞对DNA的吸收。

大肠杆菌感受态转化的原理

在一定条件下，经过连接后的DNA片段与感受态细胞混合，**42℃热激**，可以进入感受态细胞。进入感受态细胞的DNA分子通过复制、表达，使受体细胞出现新的**遗传性状**。将经过转化后的细胞在**选择性培养基**中培养，即可筛选出转化体，即带有异源DNA分子的受体细胞。

实验步骤

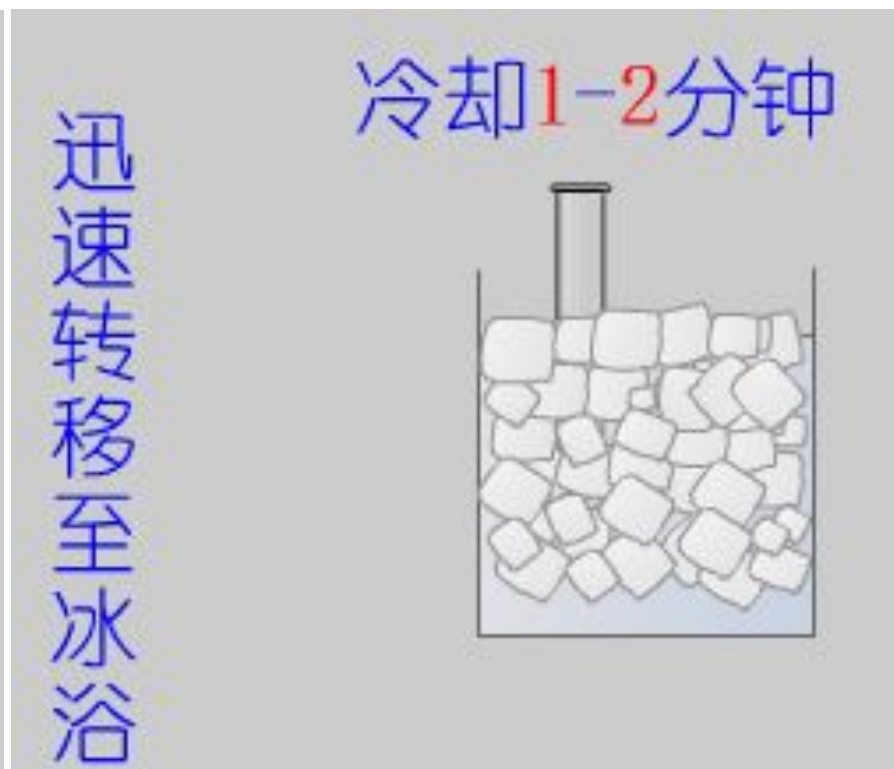
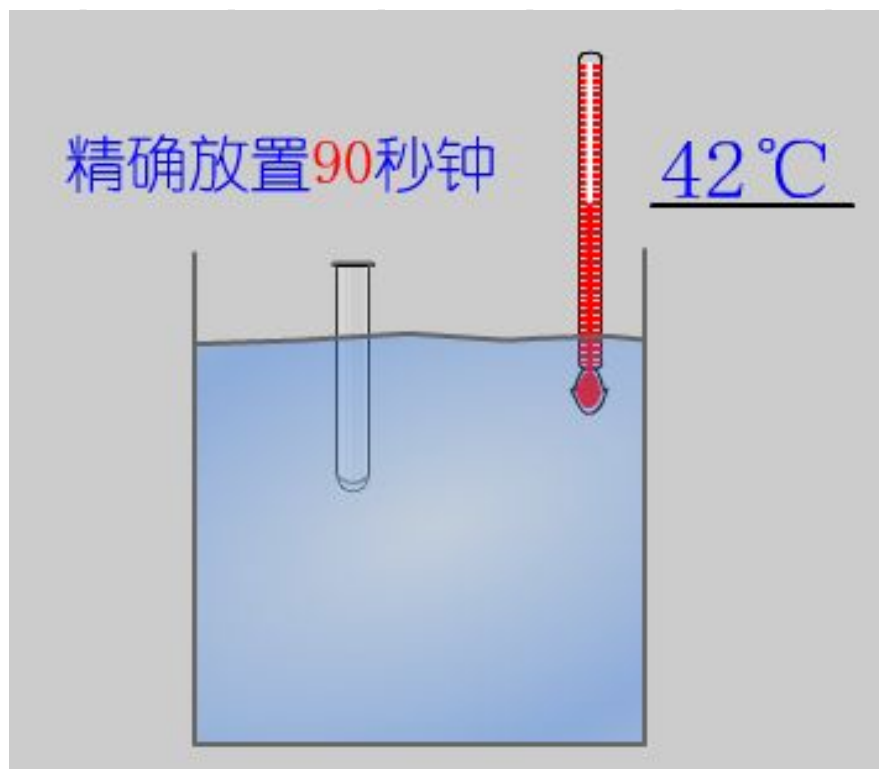
1. 取感受态细胞冰上融化，向感受态管中加入1ul DNA,轻度震荡混合后于冰上放置30分钟。

冰上放置30分钟



2. 将上述混合物转移到预热到 42°C 的水浴锅中，
热激90秒（不要摇动EP管），然后将EP管迅速
转移到冰浴，冷却1—2分钟。

热激是一个关键步骤，准确地达到热敷温度非常重要。

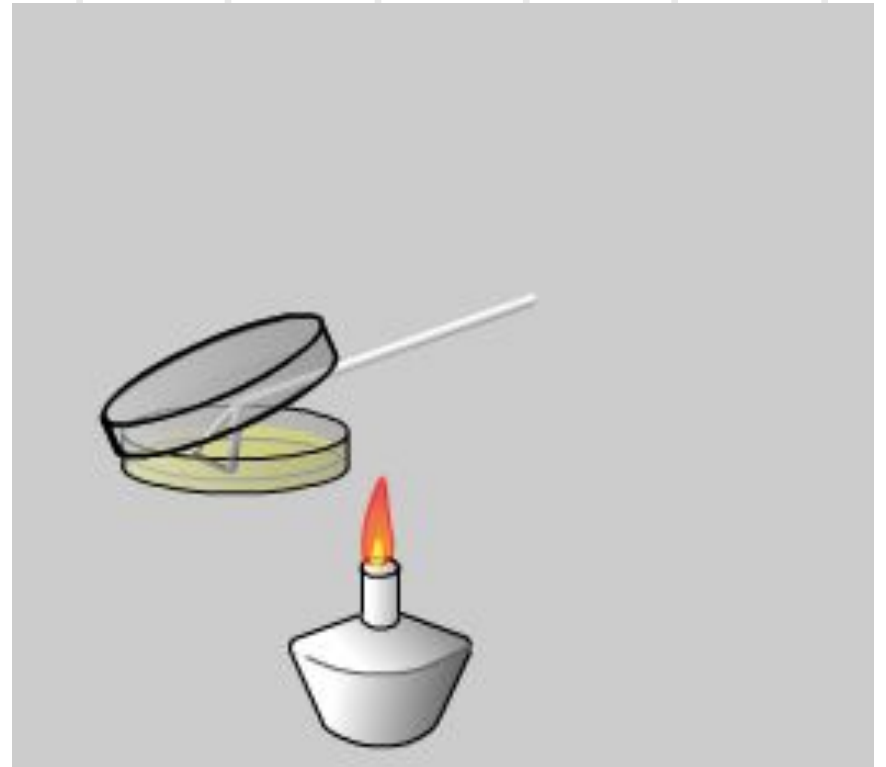
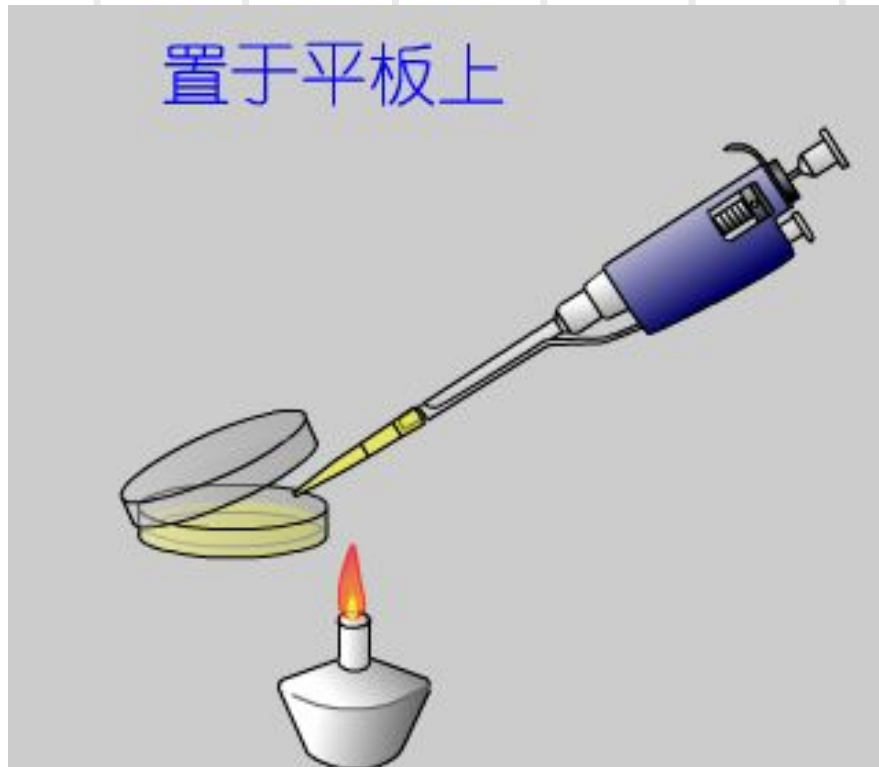


3. 向管内加入800u1的LB培养液。然后37℃
180rpm培养30-45分钟。



4. 取适量体积的转化细胞转移到含有适当抗生素的LB固体平板上，用灭过菌的玻璃棒涂布均匀。室温放置几分钟

玻璃铺菌器需先在乙醇中浸泡，然后在酒精灯上灼烧，待它凉至室温后，才可将转化菌轻轻地铺在琼脂板上



倒置平皿 37°C 培
养12~16小时



重组质粒的转化（热激法）

冰上融化感受态细胞（DH5a）



将1ul质粒（或连接产物）加入到
200ul感受态细胞，混匀，冰浴30min



42℃热激90s，勿摇动！热
激后立马放置冰上1-2min



加800ul LB液体培养基，置摇床，
37℃，180rpm 45min



7000rpm，离心1min，用枪吸取800ul上清倒掉，将剩
下的菌液重悬后涂具有相应抗生素的LB平板，
37℃倒置培养12-16h

实验预期结果

吉祥如意



吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

重组载体需要鉴定的原因

虽然只有那些含有被转化质粒的细菌才能在含有抗生素的平板上生长和繁殖，但对于连接混合物而言，此时并不能确定哪个克隆含有插入片段。



感受态转化效率评价

转化后在含抗生素的平板上长出的菌落即为转化子，
根据平板中的菌落数可计算出转化子总数和转化频率

转化子总数=菌落数×稀释倍数×转化反应原液总体积 / 涂板菌液体积

转化频率（转化子数 / 每ug质粒DNA）=转化子总数 / 质粒DNA加入量(ug)

感受态细胞总数=对照组菌落数×稀释倍数×菌液总体积 / 涂板菌液体积

感受态细胞转化效率=转化子总数 / 感受态细胞总数

- 感受态效率检测过程中要严格执行无菌操作，确保检测结果的准确性和可信度
- 此检测步骤适用于不同E.coli菌株的感受态细胞效率检测

思考题



- 1、什么是T载体，简述T载体的特点及在分子生物学实验中的应用？
- 2、什么是转化子？简述转化子鉴定的常见方法并简要分析？

