

实验6

大肠杆菌感受态制备



实验目的

- 学习掌握 CaCl_2 法制备大肠杆菌感受态细胞的原理和方法，掌握蓝白斑筛选的方法
- 熟悉菌种操作和保存
- 了解其它筛选方法。

实验原理

感受态细胞：

与噬菌体不同，质粒本身不具备感染细胞的能力，为了使细胞能吸收外源的DNA，必须改变细胞的生理状态，使其具有很高的接受外源DNA能力的细胞，这种具有接受外源的DNA能力的细胞称为感受态细胞。

CaCl₂-热激法转化原理

用低渗CaCl₂溶液在低温（0℃）时处理快速生长的细菌，改变细胞膜的通透性，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42℃短时间热激作用促进细胞对DNA的吸收，利用质粒上的遗传选择标记在LB平板上进行初步筛选转化菌落。

常用感受态制备方法比较

- **CaCl₂法**: 适用于大多数大肠杆菌菌株，迅速，重复性好，但维持感受态时间较短。
- **甘油-聚乙二醇法**: -30 °C，维持感受态状态至少180天，可能与细胞冻存液中含有一定浓度的甘油和聚乙二醇有关。
- **Inoue法制备超级感受态**: 转接后18-22 °C低温摇菌，感受态效率高， 10^8 - 10^7 /ug不等。
- **Hanahan、RbCl法、电击法**

共同点: OD600 0.4-0.6，操作低温，-40 °C或-80 °C保存

实验所需器材和试剂

器材：

恒温摇床, 电热恒温培养箱, 台式高速离心机,
无菌

工作台, 低温冰箱, 制冰机, 分光光度计, 微量移液枪。

试剂：

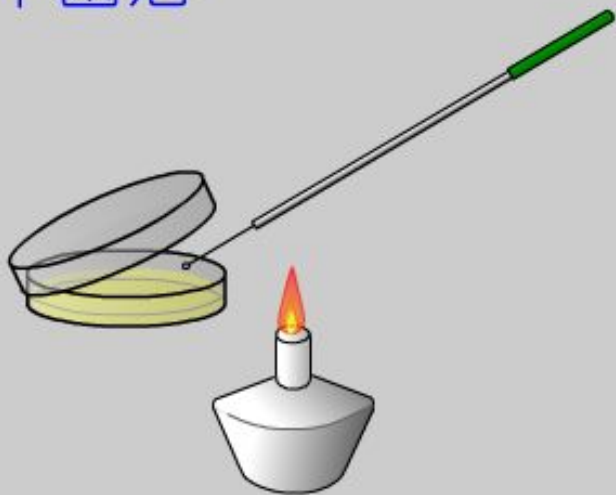
1. 100mM CaCl_2 溶液、30% 甘油

2. **限制酶和甲基化酶缺失**的大肠杆菌菌株,
如DH5 α , Top10, **BL21**

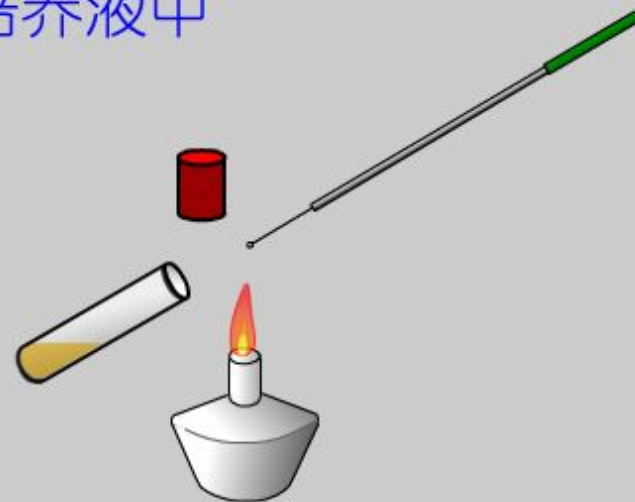
实验步骤

1. 挑取一DH5 α 单菌落于5ml LB培养液中
37℃过夜培养

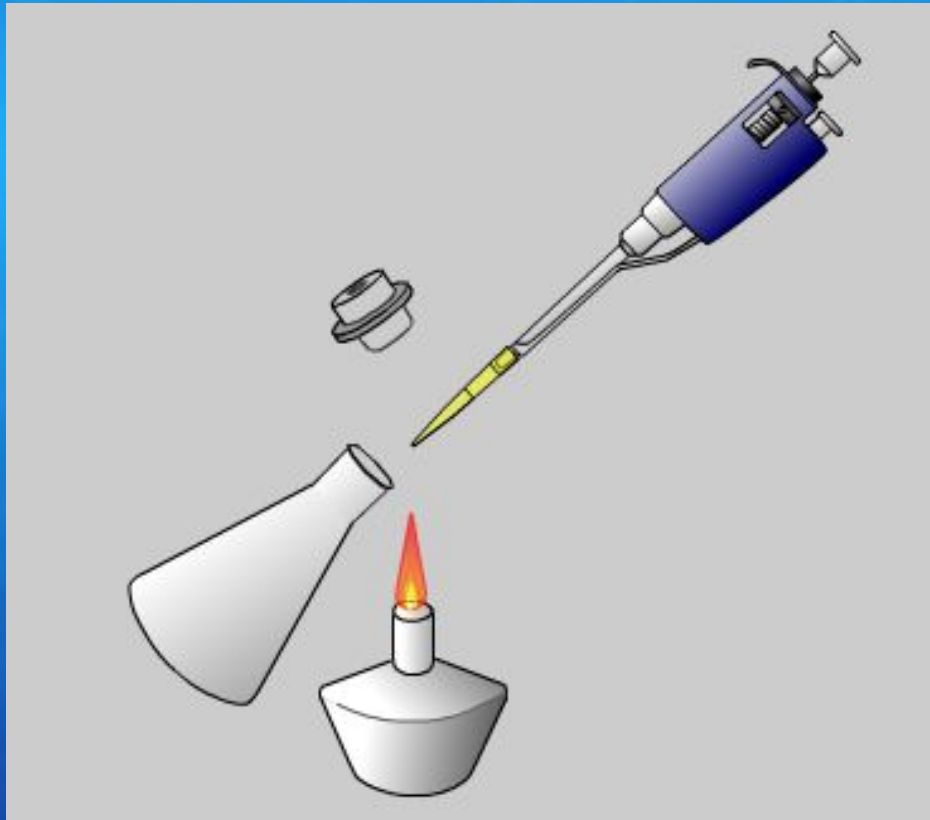
从LB平板上挑
取一单菌落



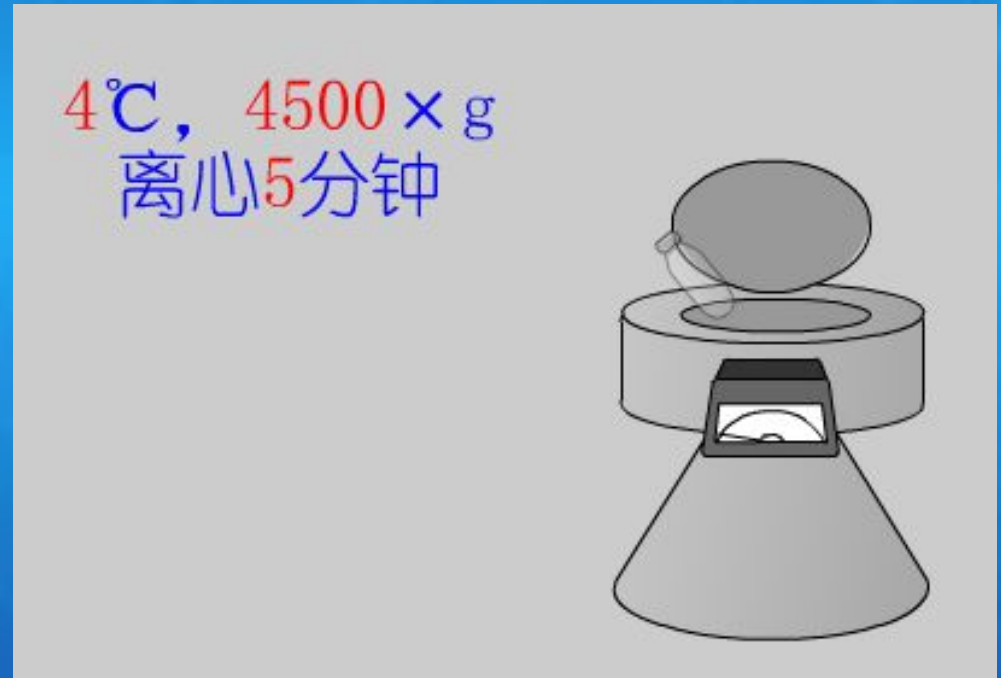
接种于2.5ml LB
培养液中



2. 取其中500 μ l菌液于一含50ml LB培养液的锥形瓶中，37 $^{\circ}$ C振摇培养至OD600值达到0.4-0.6之间



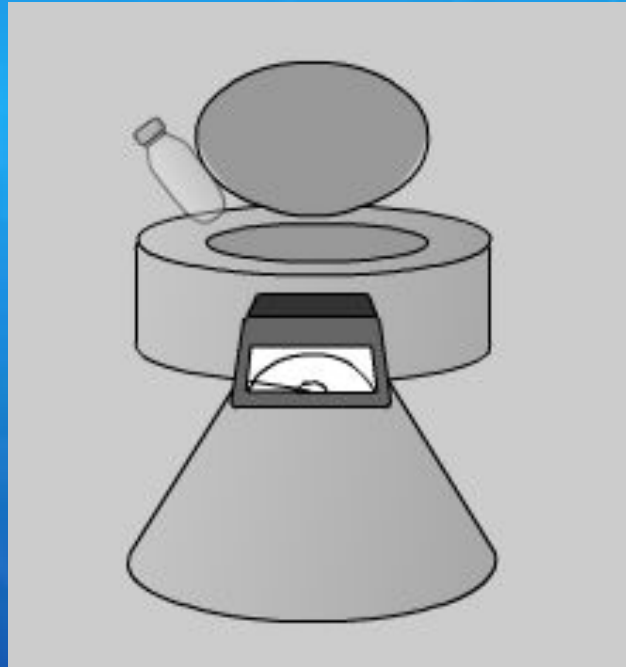
3. 取10ml菌液置于离心管内，冰浴10min，
4 °C 4500g离心5分钟，将培养液倒掉



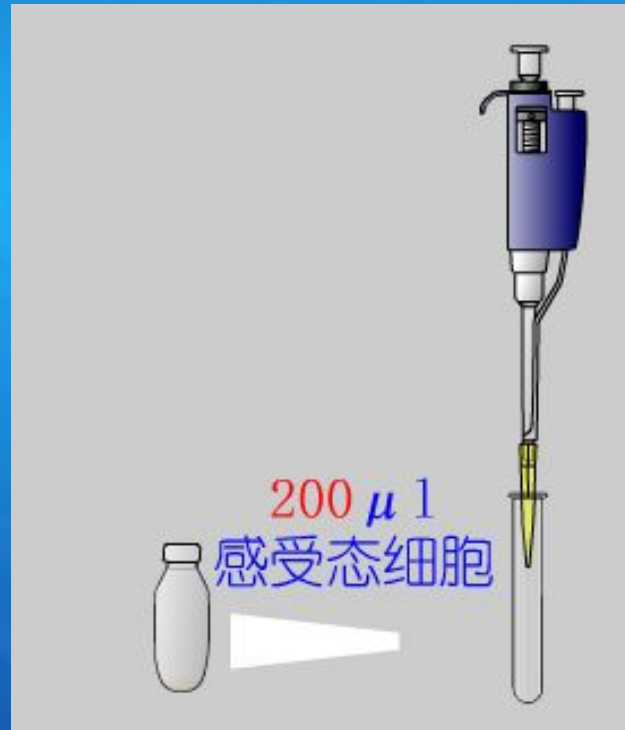
4. 加入2ml,100mM的冰冷CaCl₂溶液，摇荡重悬细胞，冰浴30分钟



5. 4℃ 4500g离心5分钟收集细胞后，加0.4ml，100mM的冰冷CaCl₂溶液轻轻悬浮细胞,冰上放置几分钟,即成感受态细胞悬液。



6. 感受态细胞等体积加入30%甘油，混匀后分装成200 μ l的小份，暂且不用的贮存于-70℃可保存半年。 取其中一份进行转化。



10ml 菌液

↓ 冰上10min

4 °C 4500g离心5 min

↓ 将培养基倒去，倒置流尽

加入2ml预冷的0.1M CaCl_2 溶液

↓ 充分溶解，冰上30min

4 °C 4500g离心5 min

↓ 将培养基倒去，倒置流尽

加入0.4ml预冷的0.1M CaCl_2 溶液，等体积加入
30%甘油，混匀



每管200ul分装进入预冷的EP管中

四、实验注意事项

为了提高转化效率，实验中要考虑以下几个重要因素：

1. **细胞生长状态和密度：**细胞生长密度以刚进入对数生长期时为好，可通过监测培养液的OD600来控制。
2. **试剂的质量：**所用的试剂，如CaCl₂等均需是最高纯度的分析纯，并用超纯水配制，最好分装保存于干燥的冷暗处。
3. **防止杂菌和杂DNA的污染：**整个操作过程均应在无菌条件下进行。

讨论思考题

- 1、请阐述转化、转染和感染的概念、区别并列举例子说明
- 2、若感受态效率低，请分析是哪几方面的原因？