

质粒转化及菌液 PCR 扩增操作手册

质粒转化

一、实验试剂及仪器

DH5a 感受态细胞, LB 液体培养基, 移液枪, 无菌离心管, 无菌培养皿, 恒温水浴锅, 离心机, 超净工作台等。

二、操作方法

- 1、感受态细胞冻融：从-70℃超低温冰箱中取 100μL 感受态细胞悬液，置于冰上慢慢解冻，待完全融化后备用。
- 2、DNA 与细胞混合：向感受态细胞中加入待转化的质粒 DNA（含量不超过 1μg，体积不超过 10μl）用移液器轻轻吹打混匀，切勿剧烈振荡，随后冰浴静置 30 分钟。
- 3、热激处理：将离心管转入 42℃水浴中，准确热击 90 秒。期间务必保持离心管静止，不要晃动。热击结束后迅速取出，立即放回冰上，继续冷却 3-5 分钟。
- 4、复苏培养：向管中加入 1mL LB 液体培养基（不含抗生素），轻轻吹打混匀后于 37℃，220rpm 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、浓缩涂板：将复苏后的菌液瞬时离心，弃去约 900 μL 上清液，保留约 100 μL 培养基重悬菌体沉淀，用移液器轻轻吹打混匀后，全部取出均匀涂布在含对应抗生素的选择性平板上。
- 6、平板培养：将涂布好的平板正面朝上，于室温下静置约 30 分钟，待菌液完全被培养基吸收后，将平板倒置放入 37℃培养箱中，培养 16-24 小时，直至单菌落清晰可见。

三、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 10%。
- 2、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。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，且注意防止被其它试剂，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。

质粒转化及菌液 PCR 扩增操作手册

菌液 PCR 扩增

一、质粒和甘油菌的存储

▲收到质粒产品后立即于-20℃保存，若计划 1 周内使用，可短暂存放于-20℃；若需更长期保存(>1 个月)，建议置于-80℃。每次取用时应置于冰上融化，剩余部分即刻回冻，严禁反复冻融。操作全程使用无核酸酶的吸头和离心管。

▲甘油菌的保存：转化后的阳性克隆需加入无菌甘油制成保种管，于-80℃冻存。推荐甘油终浓度为 20%（范围 15%~25%），浓度过高易导致菌体脱水损伤，过低则冷冻保护效果不足。

二、LB 液体培养基的配置（100mL）

胰蛋白胨 1g，酵母提取物 0.5g，氯化钠 1g

三、甘油菌的复苏

▲平板划线复苏：用无菌接种环蘸取微量甘油菌悬液，在含相应抗生素的 LB 琼脂平板上进行四区划线，于 37℃恒温倒置培养 16~24 小时，直至出现清晰单菌落。

▲液体种子制备：挑取一个形态正常的单菌落，接种至含抗生素的 5 mL LB 液体培养基中，于 37℃、220 rpm 振荡培养 16~24 小时，作为后续扩大培养的种子液。

四、质粒抽提

接菌：复苏活化后的菌液以 1:1000 的体积比转接至新鲜含抗生素 LB 培养基中。

培养：37℃，220-250rpm 的条件下于恒温摇床培养 16-24h。

提取质粒：离心收集菌体以供提取质粒使用。菌体量越多，提取的质粒量也就越多，从而可以根据所需质粒量确定接菌量。

一般情况下，接菌量与质粒量的对应关系如下：

试剂盒	菌液量	质粒量
质粒小抽试剂盒	3-5mL	20-50μg
质粒中抽试剂盒	5-45mL	75-150μg
质粒大抽试剂盒	150-250mL	500-800μg
质粒巨抽试剂盒	2.5-3.5L	5-10mg