

## 重组质粒的转化、筛选和鉴定

### 一、实验目的

- 1、学习克隆工作中最常用的双酶切；
- 2、学习将外源基因与质粒连接方法及操作技术；
- 3、学习氯化钙法制备大肠杆菌感受态细胞的技术；
- 4、了解细胞转化的概念及其在分子生物学研究中的意义。
- 5、外源质粒 DNA 转入受体菌细胞的技术以及筛选转化体的技术。
- 6、学习鉴定重组子的方法。

### 二、实验原理

重组子的建立：采用双酶切质粒载体 pBR322 和 pUC18，酶切后产生了互补的粘性末端，在 T4 DNA 连接酶的作用下，两个质粒片段连接。

感受态细胞(Competent cells)：受体细胞经过一些特殊方法（如：CaCl<sub>2</sub>，RuCl<sub>2</sub> 等化学试剂法）的处理后，细胞膜的通透性发生变化，成为能容许多有外源 DNA 的载体分子通过的感受态细胞(competent cell)。

转化 (transformation)：是将异源 DNA 分子引入一细胞株系，使受体细胞获得新的遗传性状的一种手段，是基因工程等研究领域的基本实验技术。

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。

克隆的筛选：主要用不同抗生素基因筛选。常用的抗生素有：氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素、四环素、链霉素等；

重组质粒克隆的鉴定：鉴定带有重组质粒克隆的方法常用的有  $\alpha$ -互补、小规模制备质粒 DNA 进行酶切分析、插入失活、PCR 以及杂交筛选的方法。最常用的方法是小规模制备质粒 DNA 进行酶切分析，对于带有 LacZ 基因的载体还可以结合  $\alpha$ -互补现象来筛选。

### 三、试剂与器材

1、试剂 pUC18 质粒，pBR322 质粒，DL2000 Marker, Pst I(15U/ul)及酶切缓冲液，EcoR I(15U/ul)及酶切缓冲液，DNA Ligation Kit Ver 2.1 (TaKaRa)，LB 液体培养基(Luria-Bertani)，LB 固体培养基，50mg/ml 卡那霉素(kanamycin)储存液，质粒快速提取试剂盒（博大泰克），10 X Buffer K，Pst I，EcoR I (TaKaRa)

2、器材 电基因转移仪，恒温摇床，台式高速离心机，恒温水浴锅，琼脂糖凝胶电泳装置，电热恒温培养箱，电泳仪，超净工作台，微量移液枪，eppendorf管。

#### 四、操作方法

##### 1. 构建重组质粒

质粒 pUC18 和 pBR322 分别用 Pst I 和 EcoR I 双酶切，将酶切产物按照 1: 1 的比例混合，使用 T4 DNA 连接酶连接，构建成重组质粒。

##### 2. 制备感受态大肠杆菌细胞

收集大肠杆菌细胞，采用 CaCl<sub>2</sub> 处理，制备成感受态细胞。

##### 3. 重组子的转化

将构建的重组质粒加入到制备的感受态细胞悬浮液中，电击法将重组质粒转化到宿主细胞中。

##### 4. 重组子的筛选鉴定

采用蓝白筛选重组子。酚/氯仿快速抽提质粒，酶切后电泳鉴定。

#### 五、关键步骤与注意事项

2. 连接反应温度选择要适中，过高粘末端之间形成氢键不稳定，过低会影响连接酶的活性。

3. 连接反应两种质粒的比例为 1: 1，否则容易自连。

4. 制备感受态细胞时要采用对数生长期初期的细胞，低温处理时间要足够。

5. 电击法时电击电压、电流、时间选择要合适。

6. 转化及蓝白筛选要作阴、阳性对照，防止出现假阳性、假阴性。