

大肠杆菌转化实验（热击法）

大肠杆菌转化可以：（1）将重组 DNA 分子导入大肠杆菌受体细胞进行复制，增殖和表达，以获得目的基因；（2）验证大肠杆菌感受态细胞效果；（3）用于分子生物学其他研究。

1 原理：

质粒 DNA 粘附在细菌细胞表面，经过 42℃ 短时间热击处理，促进吸收 DNA。然后在非选择培养基中培养一代，待质粒上所带的抗菌素基因表达，就可以在含抗菌素的培养基中生长。

2 器材：

旋涡混合器，微量移液取样器，移液器吸头，1.5ml 微量离心管，双面微量离心管架，干式恒温气浴（或恒温水浴锅），制冰机，恒温摇床，培养皿（已铺好固体 LB-Amp），超净工作台，酒精灯，玻璃涂棒，恒温培养箱。

3 材料和试剂：

质粒 DNA，重组 DNA，培养基（不加抗菌素），LB 培养基（加抗菌素），无菌 ddH₂O，IPTG，X-gal。

4 实验准备：

无菌 ddH₂O，1.5ml 离心管装入铝制饭盒（灭菌）、移液器吸头装入相应的吸头盒（灭菌），20%IPTG（M/V），2% X-gal（M/V，用 N,N-二甲基甲酰胺配）。

5 操作步骤：

（1）事先将恒温水浴的温度调到 42℃。

（2）从 -70℃ 超低温冰柜中取出一管（100μl）感受态菌，立即用手指加温融化后插入冰上，冰浴 5~10min。

- (3) 加入 5 μ l 连接好的质粒混合液 (DNA 含量不超过 100ng) , 轻轻震荡后放置冰上 20min。
- (4) 轻轻摇匀后插入 42°C 水浴中 1~2min 进行热休克, 然后迅速放回冰中, 静置 3~5min。
- (5) 在超净工作台中向上述各管中分别加入 500 μ l LB 培养基 (不含抗菌素) 轻轻混匀, 然后固定到摇床的弹簧架上 37°C 震荡 1h。
- (6) 在超净工作台中取上述转化混合液 100~300 μ l, 分别滴到含合适抗菌素的固体 LB 平板培养皿中, 用酒精灯烧过的玻璃涂布棒涂布均匀 (注意: 玻璃涂布棒上的酒精熄灭后稍等片刻, 待其冷却后再涂) 。
- (7) 如果载体和宿主菌适合蓝白斑筛选的话, 滴完菌液后再在平板上滴加 40 μ l 2% X-gal, 8 μ l 20% IPTG, 用酒精灯烧过的玻璃涂布棒涂布均匀。
- (8) 在涂好的培养皿上做上标记, 先放置在 37°C 恒温培养箱中 30-60min 直到表面的液体都渗透到培养基里后, 再倒置过来放入 37°C 恒温培养箱过夜。
- (9) 在被细菌污染的桌面上喷洒 70%乙醇, 擦干桌面, 写实验报告。
- (10) 观察平板上长出的菌落克隆, 以菌落之间能互相分开为好。注意白色菌斑。