

质粒转染大肠杆菌

材料试剂：胰化蛋白胨，酵母提取物，琼脂，NaCl，NaOH（调 pH），氨苄青霉素，卡那霉素，质粒提取试剂盒

仪器：高压灭菌锅，42℃恒温水浴锅，恒温摇床（37℃,225rpm），无菌培养板，消毒 1.5ml 离心管，消毒枪头，无菌操作台

实验步骤：

1. LB 培养基的配制：

在 950 ml 去离子水中加入：胰化蛋白胨 10g 酵母提取物 5g NaCl 10g 摇动容器直至溶质溶解.用 5mol/LNaOH 调 pH 至 7.0.用去离子水定容至 1L.在 15psi 高压下蒸汽灭菌 20min.

固态培养基

LB 固体培养基及倒板：

(1) .配制：100mlLB 培养基加入 1.5g 琼脂粉

(2) .抗生素的加入：高压灭菌后，将融化的 LB 固体培养基置于 55℃的水浴中，待培养基温度降到 55℃时（手可触摸）加入氨苄青霉素（终浓度为 50μg/ml），以免温度过高导致抗生素失效，并充分摇匀。

(3) .倒板：一般 10ml 倒 1 个板子。培养基倒入培养皿后，打开盖子，在紫外下照 10-15 分钟。

(4) .保存：用封口胶封边，并倒置放于 4℃保存，一个月内使用。

2. 从-70℃冰箱中取 200μl 感受态细胞悬液，室温下使其解冻，解冻后立即置冰上。

3. 加入质粒 DNA 溶液（含量不超过 50ng，体积不超过 10μl），轻轻摇匀，冰上放置 30 分钟后。

4. 42°C水浴中热击 **45s/90s**，热击后迅速置于冰上冷却 3-5 分钟。
5. 向管中加入 1ml LB **液体培养基 (不含 Amp)**，混匀后 37°C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 (Amp^r)。
6. 将上述菌液摇匀后取 100μl 涂布于含 Amp 的筛选平板上，正面向上放置半小时，待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿，37°C培养 16-24 小时。

同时做两个对照：

对照组 1：以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液，其它操作与上面相同。此组正常情况下在含抗生素的 LB 平板上应没有菌落出现。

对照组 2：以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液，但涂板时只取 5μl 菌液涂布于不含抗生素的 LB 平板上，此组正常情况下应产生大量菌落。

大肠杆菌的扩增

1. 从 LB 平板上挑取新活化的单个菌落，接种于 3-5ml LB 液体培养基中，37°C下振荡培养 12 小时左右，直至对数生长后期。将该菌悬液以 1: 100-1: 50 的比例接种于 100ml LB 液体培养基中，37°C振荡培养 2-3 小时至 OD₆₀₀ = 0.5 左右。
2. 取上述培养液置于冰中 10min，之后转移到已灭菌的 50ml 离心管中再于冰上放置 5min
3. 于 4°C离心，2700rpm，10min，弃上清，收集细菌
4. 质粒的提取

准备大肠杆菌质粒提取盒和扩增的带质粒大肠杆菌培养液

5. **质粒鉴定 (琼脂糖凝胶电泳)**

质粒转染细胞株

材料

细胞株、质粒、培养基、链霉素/青霉素（双抗）、FCS（小牛血清）、PBS（磷酸盐缓冲溶液）、胰酶/EDTA 消化液、**转染试剂**（Lipofectamine TM2000）

实验步骤

I .准备细胞：

贴壁细胞：转染前 24 h，在 500 μ L **无双抗**完全培养基中接种 $0.5-2 \times 10^5$ 个细胞，转染时细胞融合度为 80 - 90% 。（注：铺板时要将细胞消化完全混匀，避免细胞堆积生长。）

II . 对于每个转染样品，按下面的方法准备：

(1) 用 50 μ L Opti-MEM 稀释 0.8 μ g 质粒 DNA，轻轻吹吸 3 - 5 次混匀，室温下静置 5 min。

(2) 轻轻颠倒混匀转染试剂，用 50 μ L Opti-MEM 稀释 2.0 μ L Lipofectamine TM2000，轻轻吹吸 3 - 5 次混匀，室温下静置 5 min。

(3) 混合转染试剂和质粒 DNA 稀释液，轻轻吹吸 3 - 5 次混匀，室温下静置 20 min。注：转染复合物一旦形成，应立即加入培养皿中进行细胞转染。

(4) 转染复合物加入到 24 孔细胞板中，100 μ L/孔，前后轻摇细胞板混合均匀。

(5) 将细胞板置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h 左右，进行换液，换成含 10% 血清的普通培养基，在 37°C，5%CO₂ 孵育箱中继续培养 24h 左右。

稳定转染细胞株的筛选（各种细胞用什么抗生素筛选呢）

从 37°C，5%CO₂ 孵育箱中取出培养皿，弃去含转染试剂的培养基，用 PBS 冲洗细胞 2 遍，胰蛋白酶消化，接种 1/2 的细胞到 100 mm 培养皿中，加入含 500 μ g/ml G418 的新鲜培养基，每 2-3 天更换一次新的筛选培养基，每天观察细胞的死亡情况。当正常细胞

完全死亡后, 换用新的不含 G418 的培养基培养。每天观察细胞生长状态。在细胞达到 60% 汇合率时再用含 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 的培养基筛选一次。当细胞达到 90%以上汇合率时将细胞转移至培养瓶中继续培养 (转染后 10-12 天左右)。以后每隔 4-5 天再用含 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 的培养基筛选。直到稳定表达转染质粒的细胞达到一定数量后可以收集样品 (约转染后 15 天左右)。以后继续培养时加入的 G418 浓度降一半。