

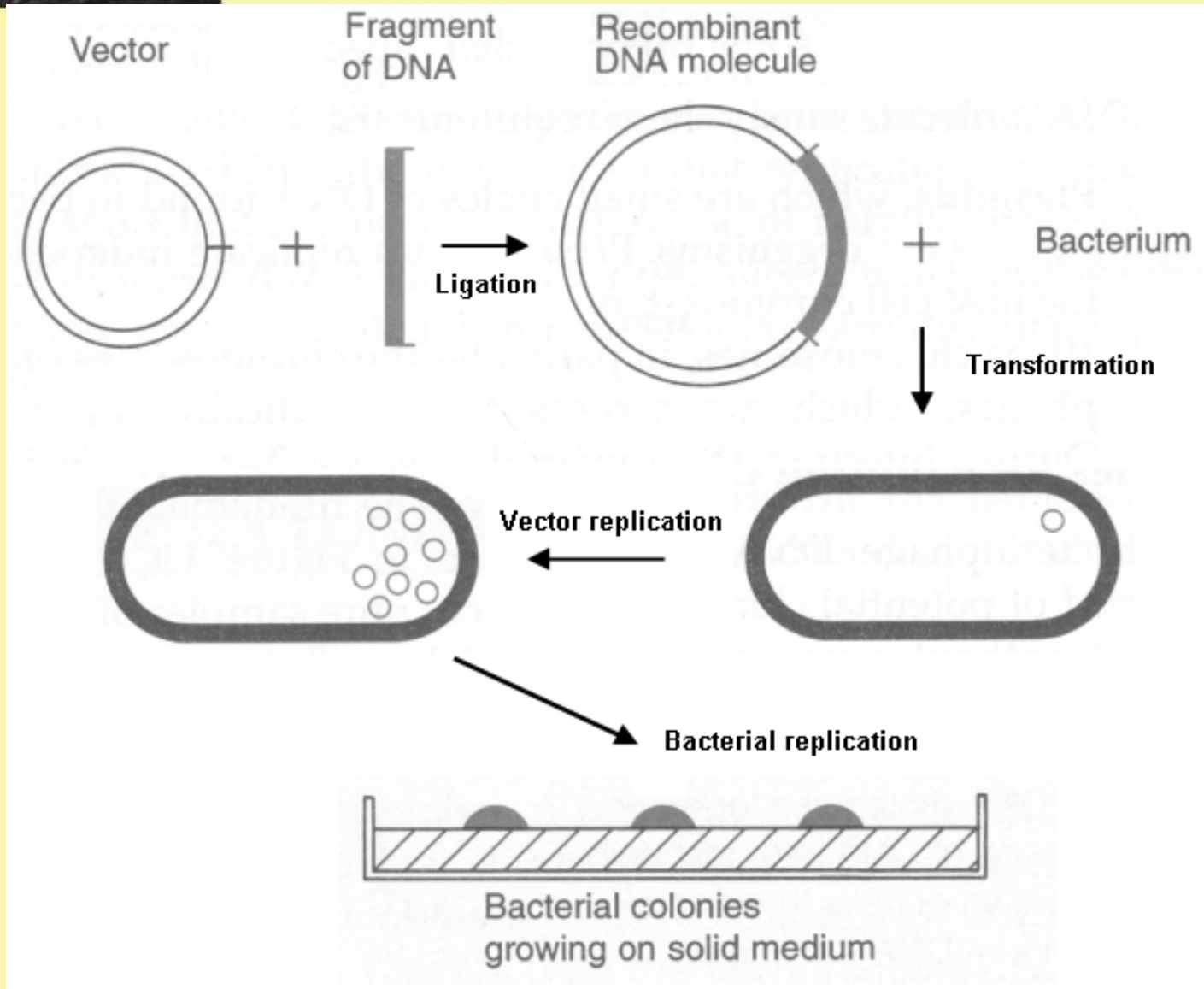
实验四:目的基因的连接、转化





实验目的及背景

- 当我们已经获得目的基因片段，选择好适当的克隆（或表达，转化）质粒载体，并确定重组方案后，下面要进行的就是DNA片段之间的体外连接，从而获得重组子。
- 此重组子可转入相应的宿主菌中用于对目的基因的扩增以及目的基因表达（如现代基因工程药物的生产），还可用于序列分析和转基因等重要生物技术的研究中。





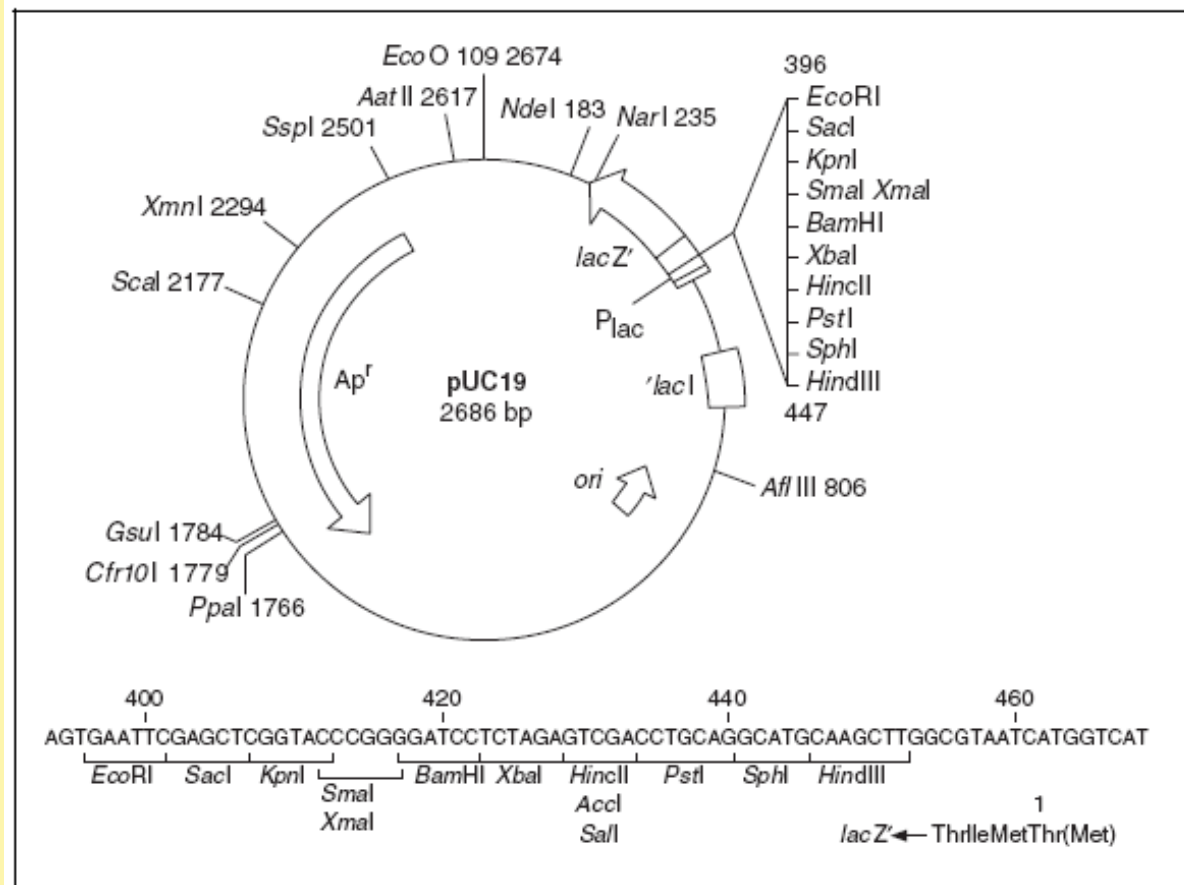
本次课程的实验内容:

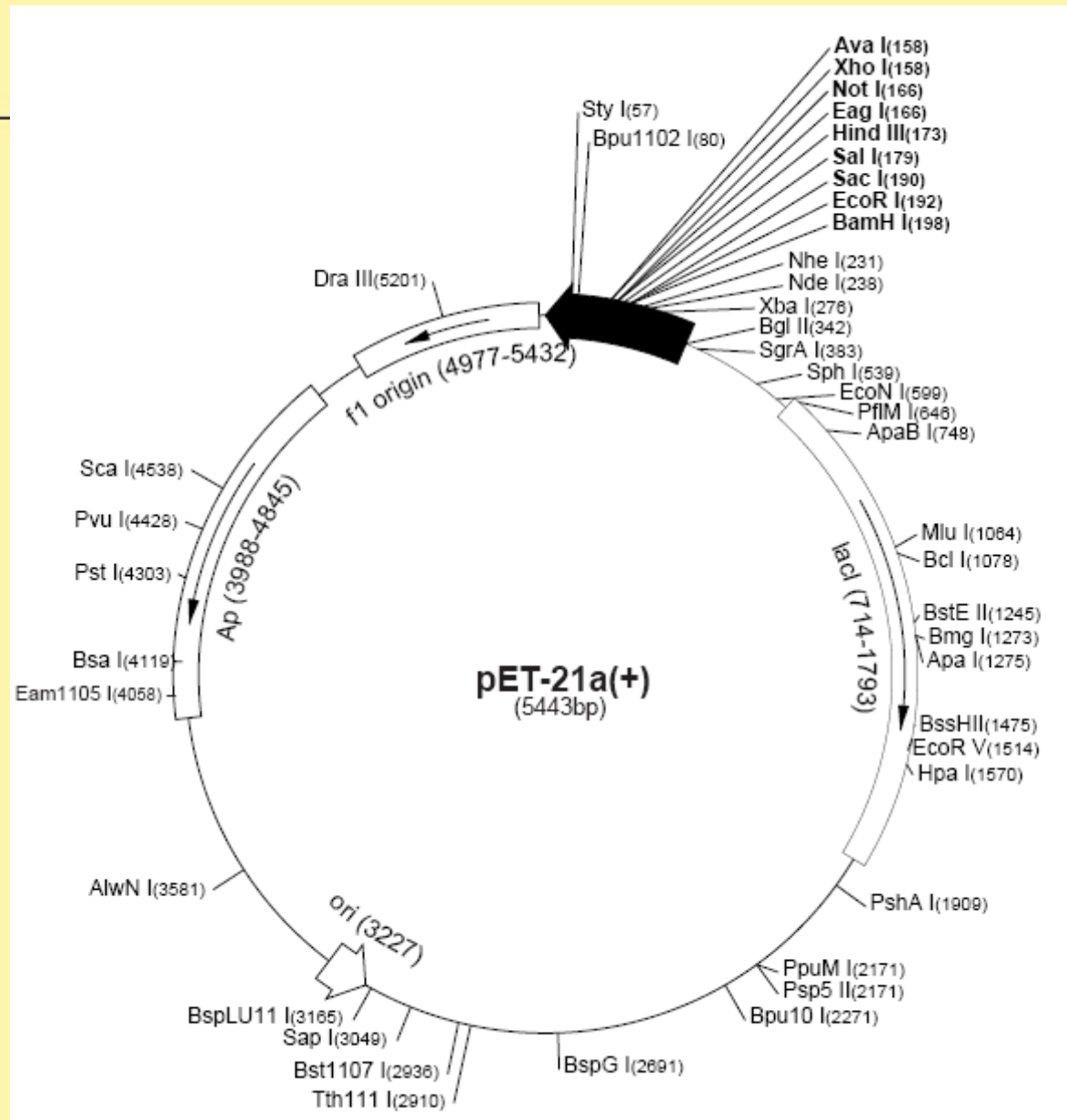
1. 目的基因浓度测定
2. 线性化载体和目的基因体外重组
3. 感受态大肠杆菌的制备
4. 重组子的转化
5. 转化大肠杆菌的培养

质粒载体

质粒载体特点

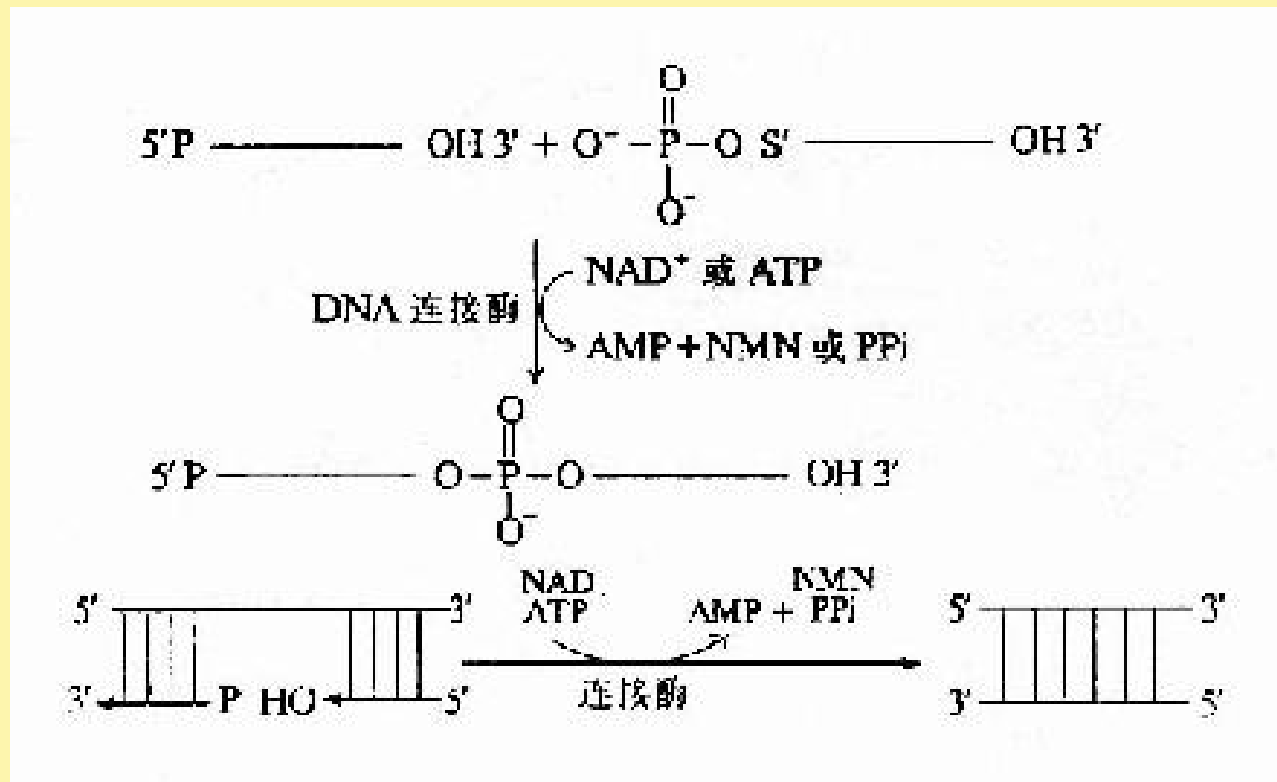
1. 至少有一个复制起点，因而至少可在一种生物体中自主复制。
2. 至少应有一个克隆位点，以供外源DNA插入。
3. 至少应有一个遗传标记基因，以指示载体或重组DNA分子是否进入宿主细胞





2. DNA分子的体外重组

- DNA分子的体外连接就是在一定条件下，由DNA连接酶催化两个双链DNA片段相邻的5'端磷酸与3'端羟基之间形成磷酸二酯键的生物化学过程。



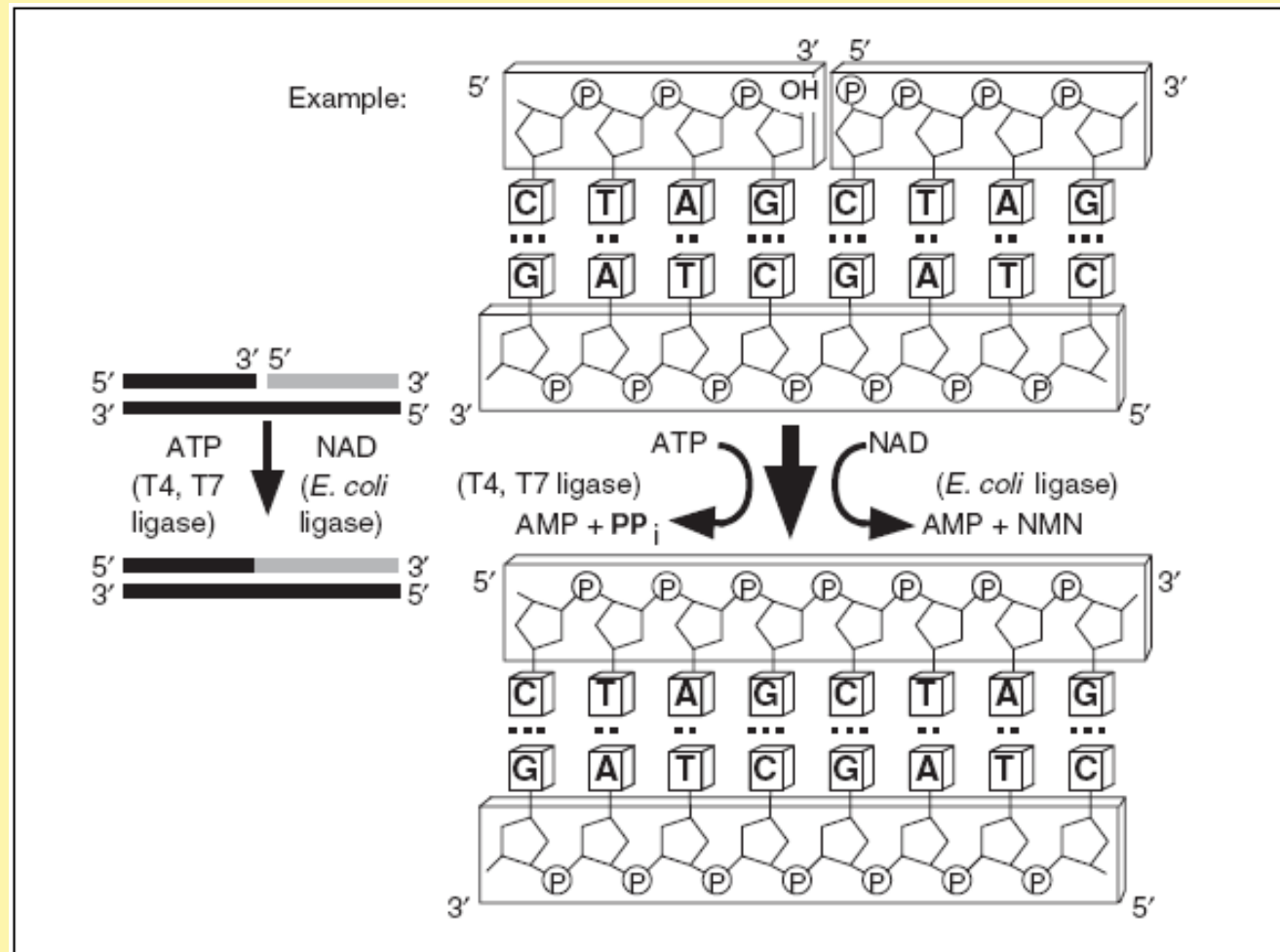


DNA连接酶

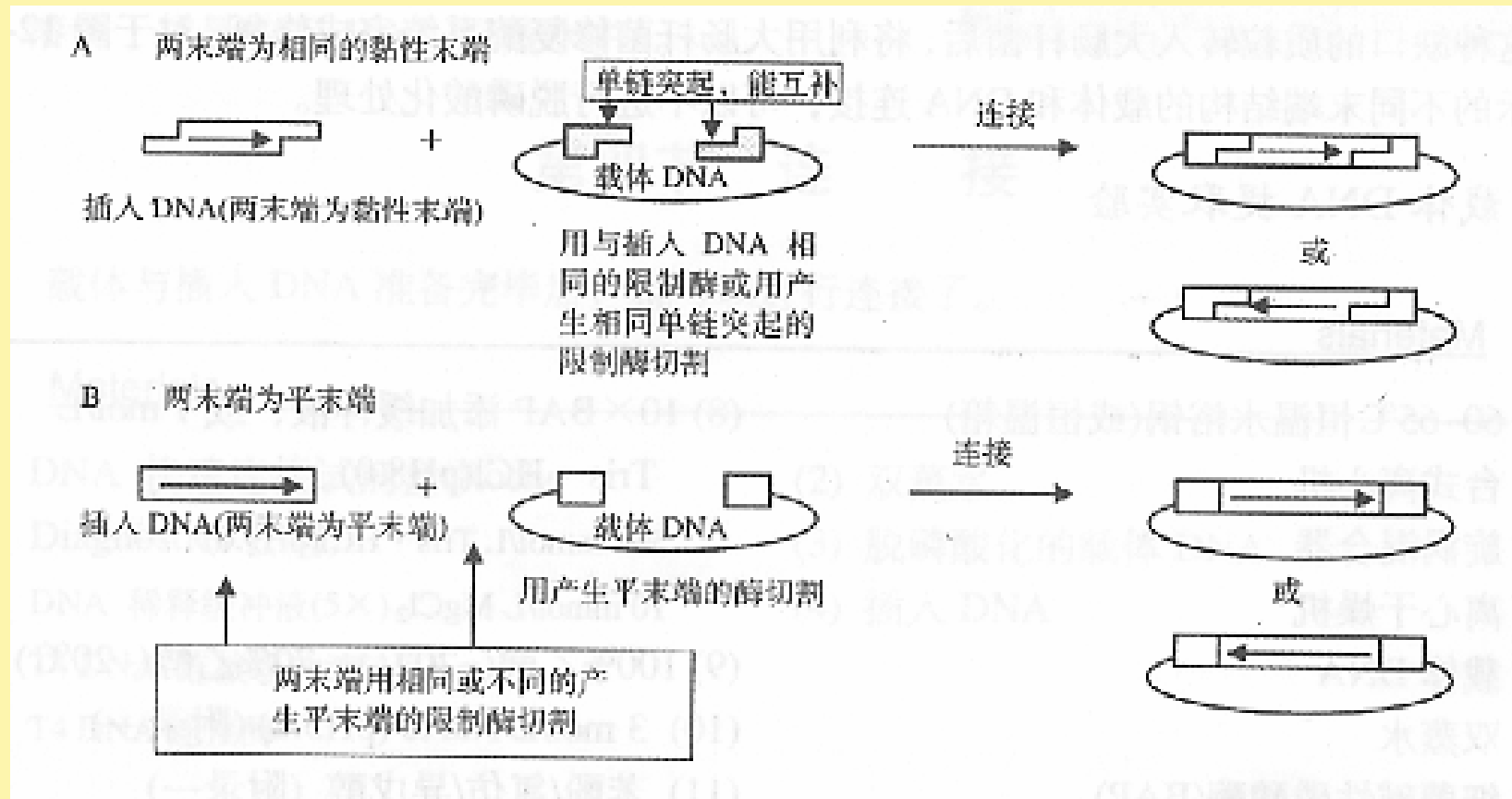
常用的DNA连接酶有两种：

(1) 来自大肠杆菌的DNA连接酶

(2) 来自噬菌体的T4 DNA连接酶。



DNA连接示意图





连接反应中值得注意的几个问题：

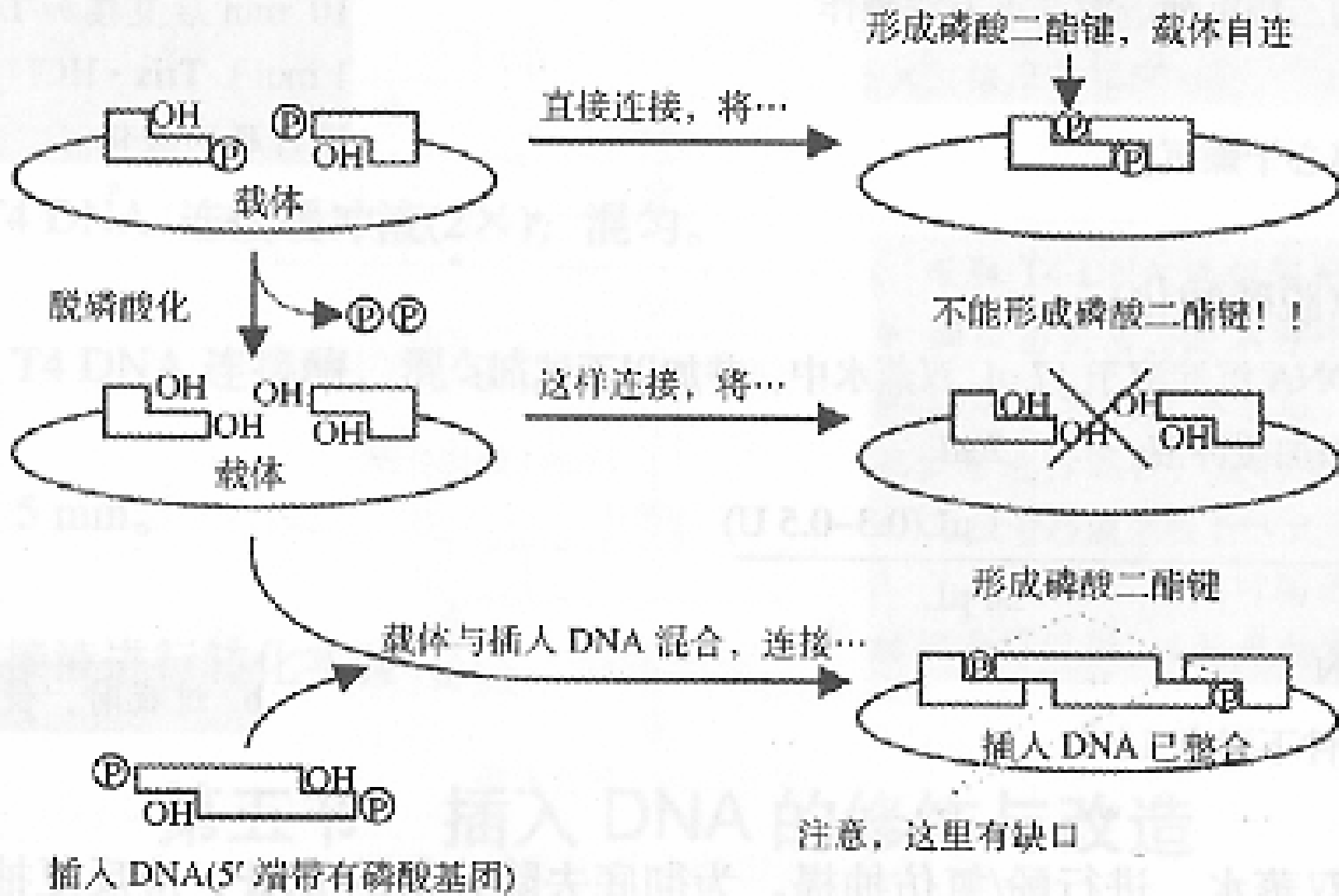
1. 载体和插入片段的摩尔浓度比载体：插入片段的摩尔数的变化范围可为8: 1到1: 16，但通常的变化范围是3: 1到1: 3。插入片段的长度和序列的变化会影响和同一载体的连接效果。每一个连接反应都需要作实验，来选择最佳的载体和插入片段的摩尔数比。在最小的反应体积中，通常一个连接反应用10-50ng的载体DNA。
2. 进行连接反应时的保温的时间和温度也需优化。一般而言，平末端连接在22℃保温4-16小时，粘性末端在22℃保温3小时，或16℃保温16小时。大多数连接反应用T4DNA连接酶，但大肠杆菌的DNA连接酶可用于粘性末端的连接，平末端连接时用此酶，活力较低。
3. 载体和插入片段的纯度应较高，溶解的溶剂最好使用灭菌的双蒸水而不是TE，毕竟TE中含有离子，可能影响连接反应。



碱性磷酸酶处理质粒载体

- 为了提高连接效率，一般采取提高 DNA 的浓度，增加重组子比例。这样就会出现 DNA 自生连接问题，为此通常选择对质粒载体用碱性磷酸酶处理，除去其 5' 末端的磷酸基，防止环化，通过接反应后形成的缺口可在转化细胞后得以修复。

载体自连及去磷酸化示意图





常用碱性磷酸酶

BAP (大肠杆菌)

分子量 80,000

温度 60 °C —65°C

最适PH8.0

热稳定性好, 100 °C暂时性失活,
室温放置可恢复活性, 苯酚完全失活

CIAP (小牛肠)

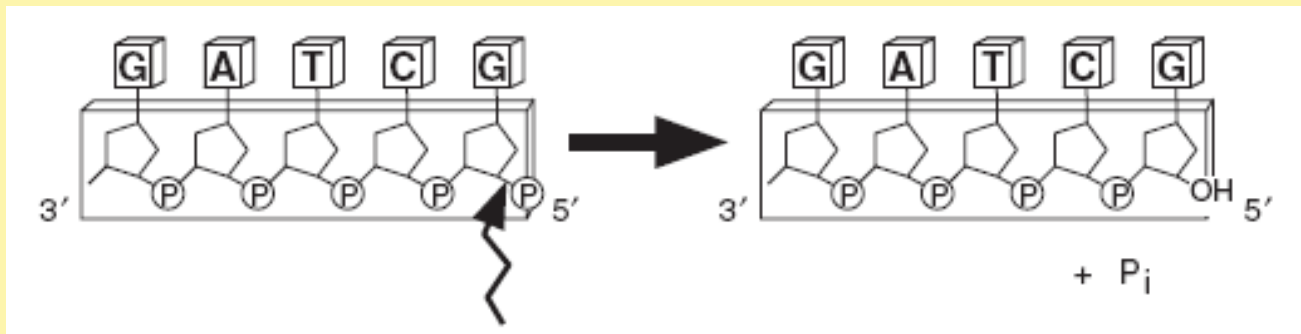
分子量 100,000

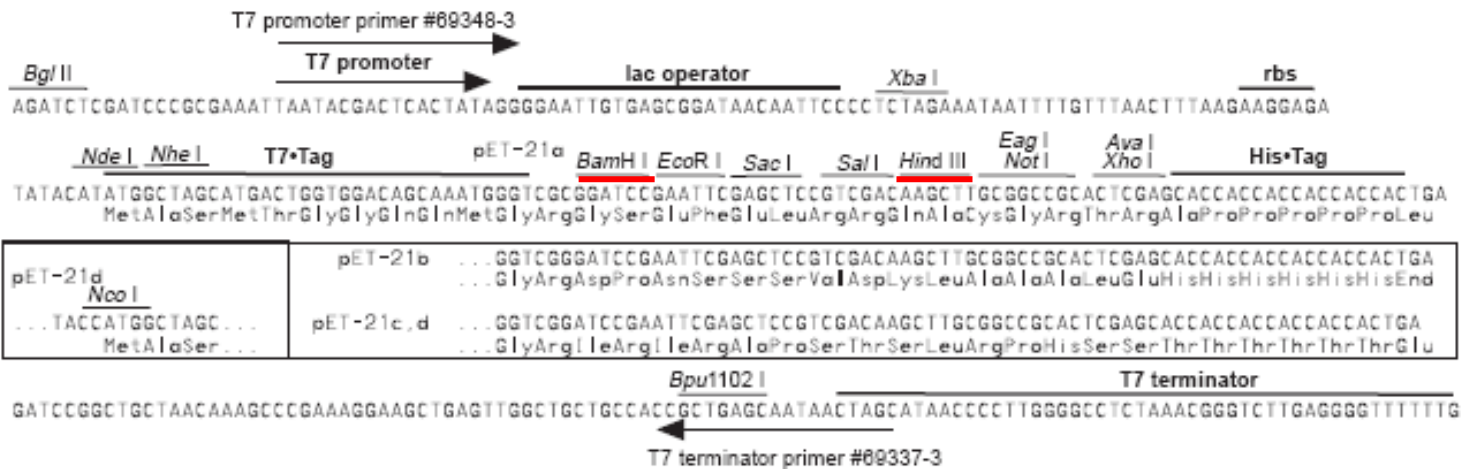
温度 37 °C

最适PH10.0附近 (高底物浓度)

PH 8.0附近 (低底物浓度)

65°C30分钟处理99%的活性不可
逆失活, 随具体条件改变有变
动, 完全失活苯酚处理



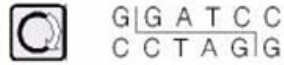


pET-21a-d(+) cloning/expression region

本实验连接材料及连接体系

限制酶

BamH I



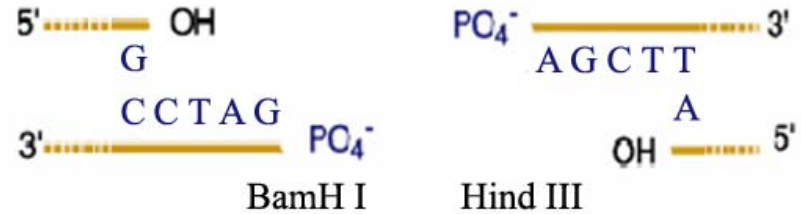
Hind III



BamH I and Hind III digested DNA sample

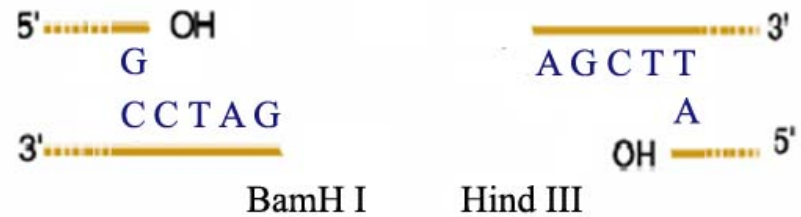


BamH I and Hind III digested plasmid vector



Alkaline phosphatase

BamH I and Hind III digested plasmid vector



Combine and add
DNA ligase + ATP



■ DNA Ligation Kit Ver. 2.0的操作示意图及连接效率图

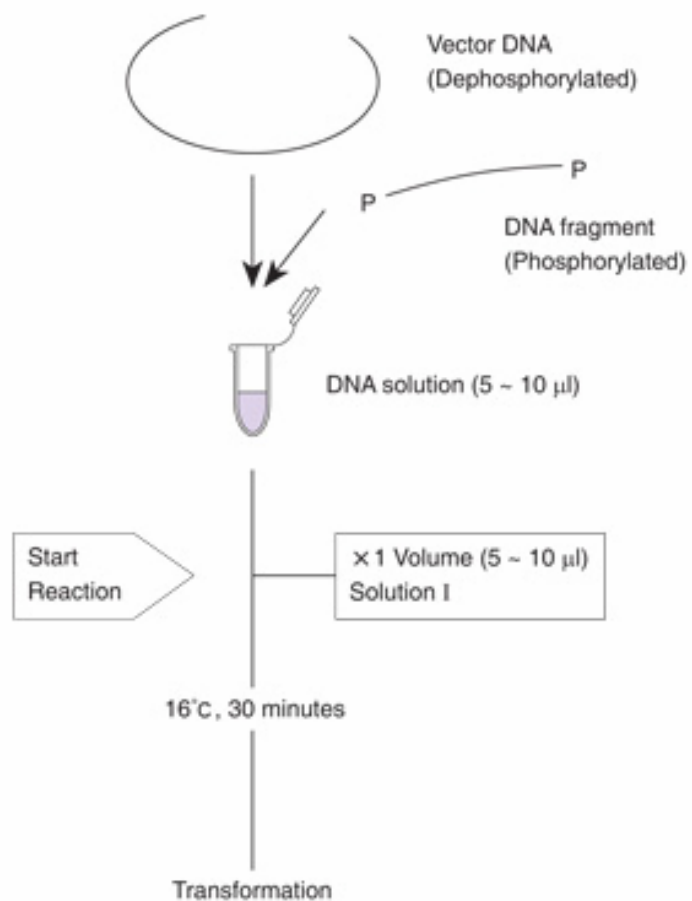


图1 Ligation Kit Ver. 2.0的操作示意图

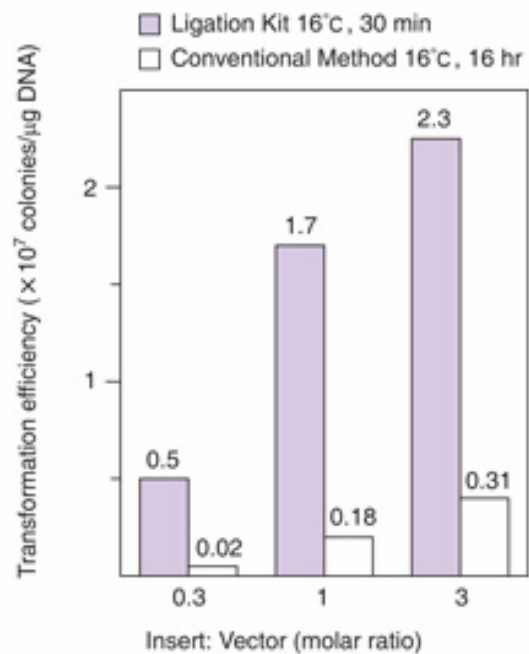


图2 用Ligation Kit Ver. 2.0连接后的转化效率比较图



连接体系

载体DNA	50 ng	0.5ul
目的DNA	19 ng	? ul
双蒸水		? ul →5ul
连接反应液 (2×)		5ul
总体积		10ul

用加样器柔和吹打混匀,16℃连接2小时。

附注：载体和目的基因的摩尔比为1:3

$50\text{ng}:5.4\text{kb}=6.3\text{ng}:0.7\text{kb}$

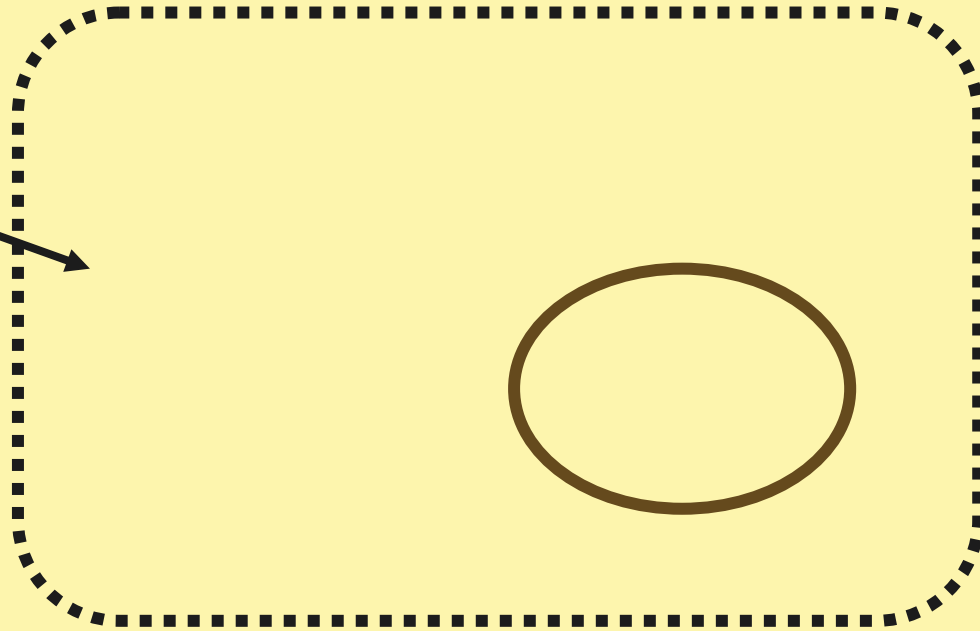
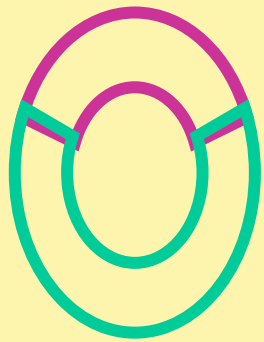
$6.3\text{ng}\times 3=19\text{ng}$



2. DNA的转化

- **感受态细胞的制备**
- 所谓感受态，就是细菌吸收转化因子的生理状态。

重组体的转化



受体细胞



原核细胞的转化（细菌转化）

1) 受体细胞的选择

限制缺陷型： 避免修饰和降解

重组缺陷型： 避免重组整合

转化亲和型： 较高的可转化性

遗传互补型： 利于筛选

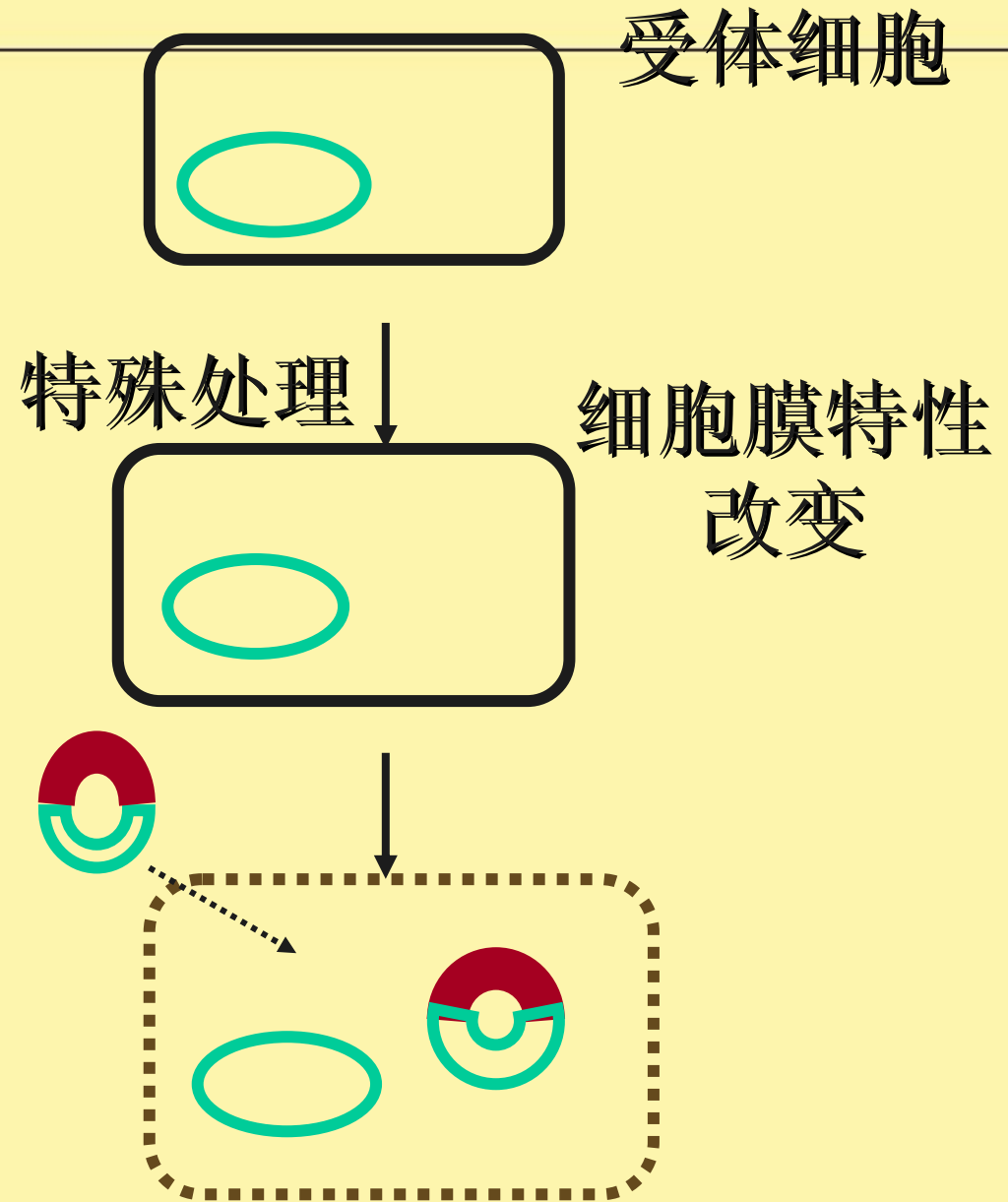
感染缺陷型： 防止感染

本实验中使用的受体细胞为大肠杆菌DH5 α 1pha菌株。



2) 转化方法

CaCl₂诱导转化
电穿孔

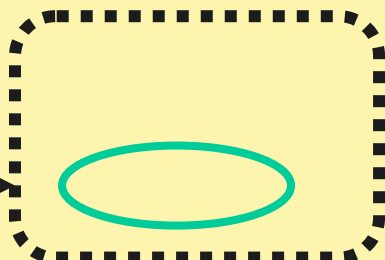




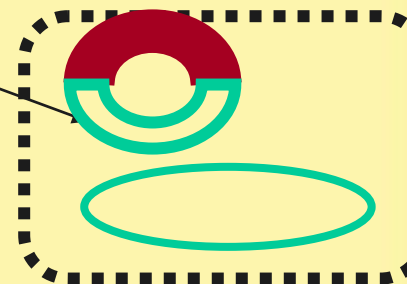
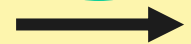
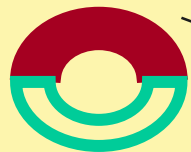
受体细菌

50-100mmol/L

CaCl_2



感受态
细菌



重组体转
入细菌

CaCl_2 处理



CaCl₂法制备感受态细胞流程

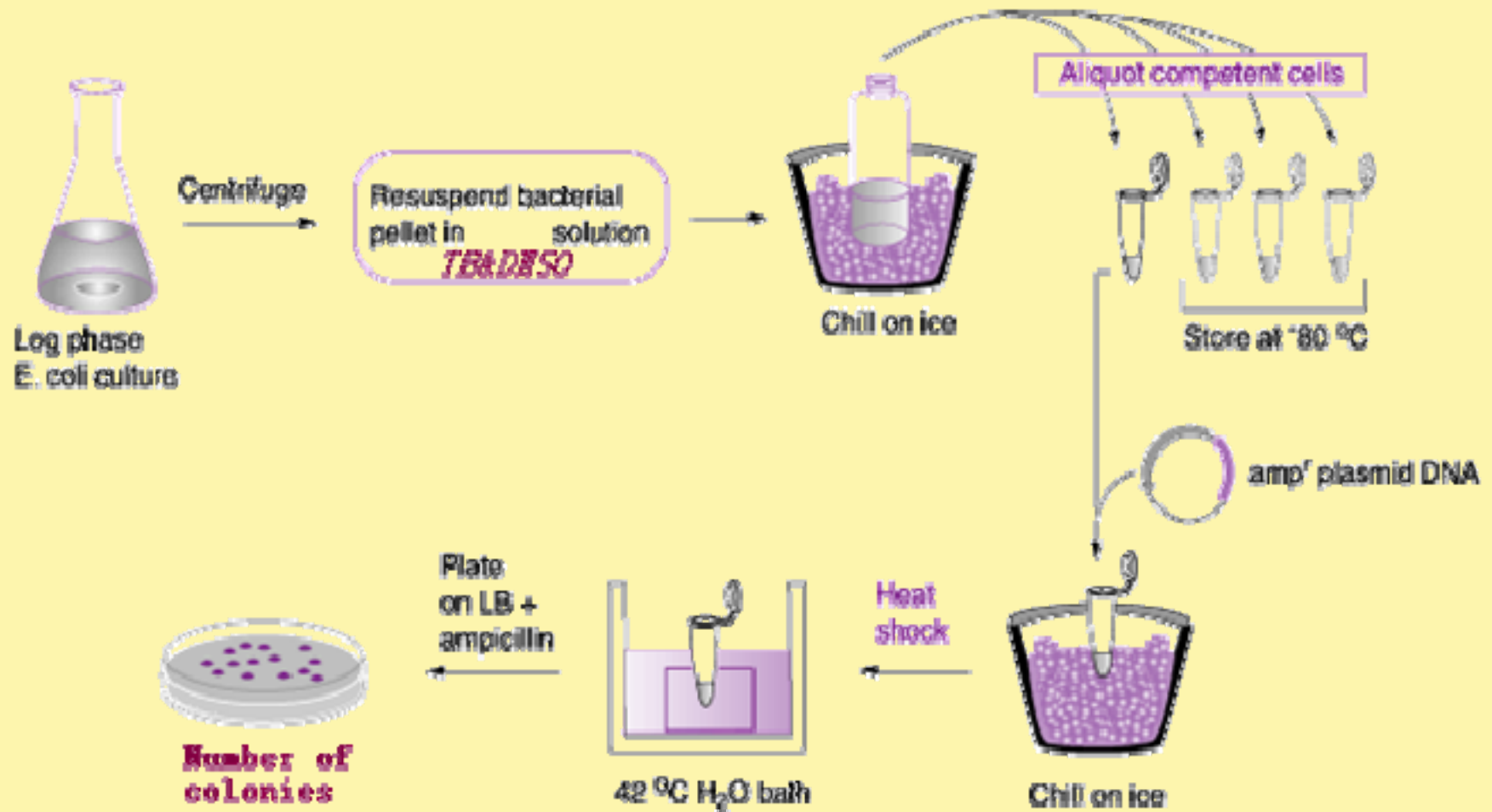
1. 将宿主菌在琼脂培养基平板上划线，37℃培养16~20小时。
2. 挑取单菌落转入10ml LB培养基中，37℃振荡培养过夜。
3. 从中吸取1ml转入50ml LB培养基中37℃振荡培养，测OD₆₀₀达0.4~0.6。
4. 培养物在冰浴中放置10分钟。
5. 取1.5ml加入预冷的Eppendorf管中，于5000rpm下室温离心2--5分钟。
6. 弃上清，加入1ml用冰预冷的0.1M CaCl₂，混匀，置冰上10分钟。
7. 5000rpm 4℃离心5分钟，弃上清，加100ul 0.1M CaCl₂重悬，置冰浴备用或于4℃短期保存。
8. 若欲将制备的感受态细胞长期保存，将制备的细胞重悬于含有15%甘油的0.1M CaCl₂中，放入-80℃冰箱或液氮中冻存。。



转化

- 取制备好的感受态细胞，置于冰浴上；
- 向感受态细胞中加入连接产物（不超过转化体系的1/10体积），柔和混匀后冰浴上放置30min；
- 将连接体系放入42℃水浴中热激90sec；迅速转入冰浴2min；
- 加入0.8ml LB培养基，37℃振荡培养45min；
- 取适量培养物涂布于Amp+ LB固体培养基，放入37℃培养箱中培养。

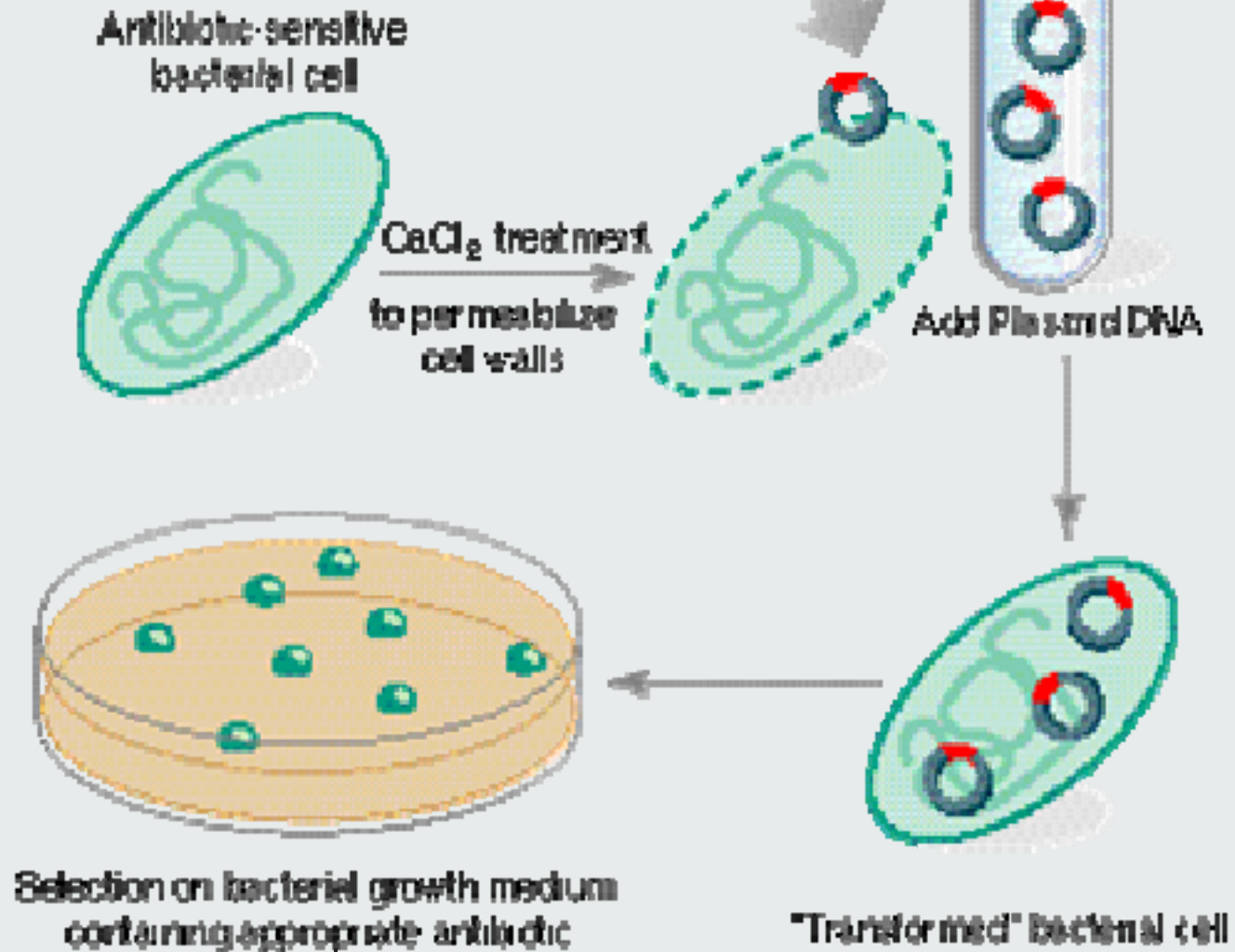
转化示意图





1. 0℃的CaCl₂低渗溶液中，使细胞膨胀，同时Ca²⁺使细胞膜磷脂层形成液晶结构，使得位于外膜与内膜间隙中的部分核酸酶离开所在区域，这就构成了大肠杆菌人工诱导的感受态；
2. 加入DNA，Ca²⁺又与DNA结合形成羟基-磷酸钙复合物，并粘附在细菌细胞膜的外表面上；
3. 经短暂的42℃热脉冲处理后，细菌细胞膜的液晶结构发生剧烈扰动，随之出现许多间隙，致使通透性增加，DNA分子便趁机进入细胞内。

用氯化钙化学转化





连接效率的计算

连接效率=

$$\frac{\text{转化子数}}{\text{载体质量}} \times \text{转化效率} \times 100\%$$

(个/ ng) (个/ ng)



Thanks !