

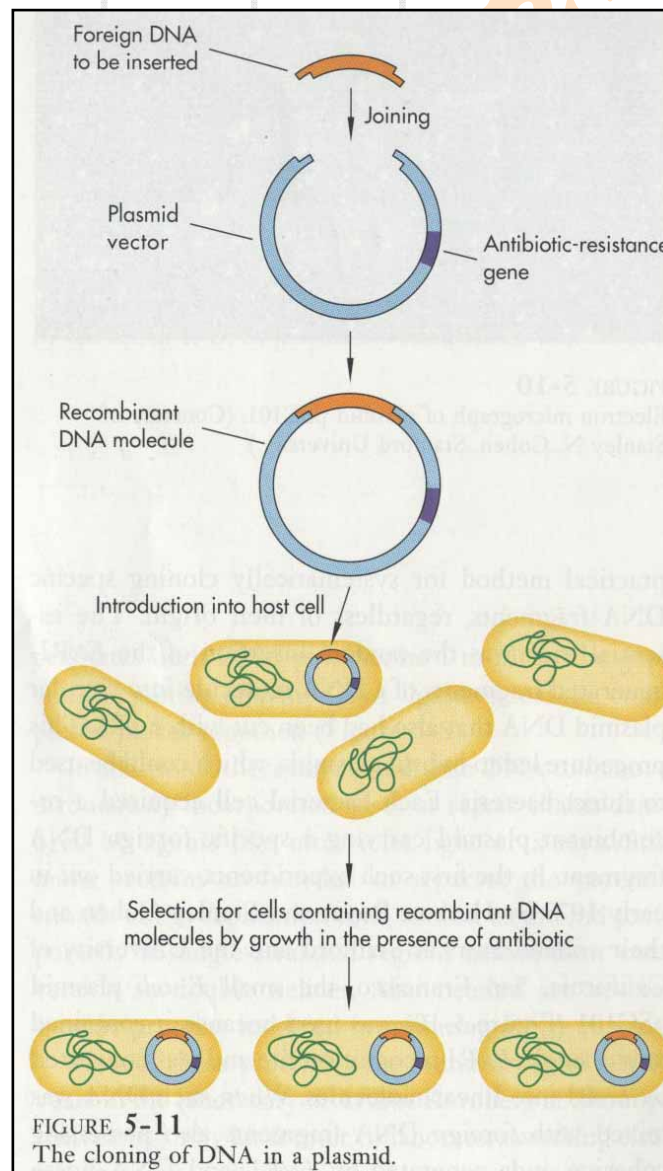
# 转化子的筛选

## ——菌落PCR



# DNA克隆的过程

- 获得目的DNA片段  
(提取质粒DNA、PCR、酶切)
- 载体DNA与目的基因连接
- 转化受体细胞
- 筛选转化子
- 表达目的基因





- 连接反应后，可形成多种类型的DNA分子
  1. 不带外源DNA的载体自连分子
  2. 外源DNA彼此相连的多聚DNA分子
  3. 载体与外源DNA相连的分子

- 通过筛选鉴定：

1. 有没有外源DNA
2. 外源DNA的连接方式是否正确



# 重组子筛选方法



- 遗传检测法
- 物理检测法
- 菌落原位杂交法
- 免疫化学检测法
- 测序
- 菌落PCR

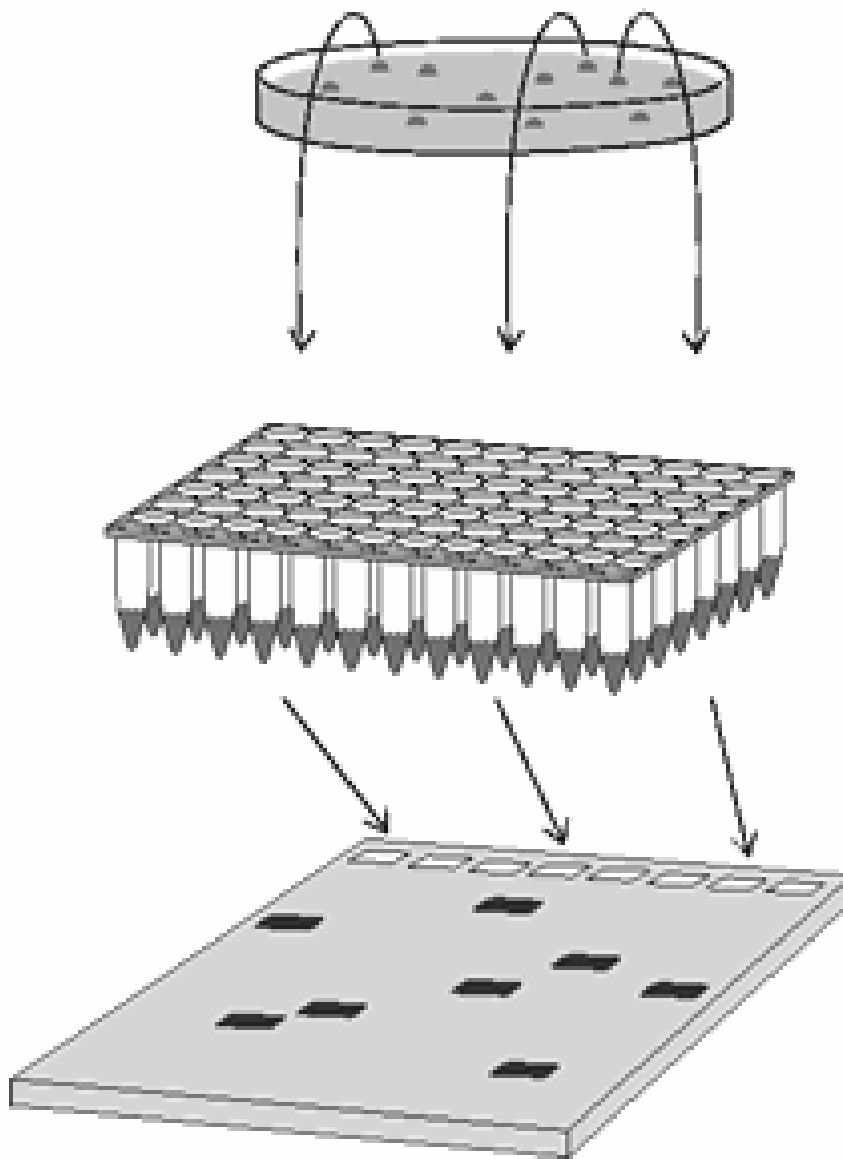




- **菌落PCR**：是直接以转化菌的单个克隆为模板，通过特异性引物或通用引物对插入载体中的目的基因快速扩增，用于鉴定和筛选阳性转化菌的技术。
- 与传统的鉴定方法相比，由于其具有快速、经济、简便的特点而被广泛用于转化菌、特别是大量转化子的鉴定和筛选。



# 吉祥



# 操作步骤



- 在PCR管中加入PCR pre-Mix（已配好）
- 为平板上将要挑取的菌落标上号码（每组挑取8个菌落），用无菌牙签挑选单菌落，将菌落转至PCR管中（牙签在pre-mix中洗一下），然后将牙签点在LB(+Amp)平板，记录号码。
- 设定PCR程序，开始PCR。
- 电泳检测。
- LB平板过夜培养，选取正确的菌落。



菌落PCR体系： 20 ul  
2 × PCR pre-mix: 10 ul  
(with Mg<sup>++</sup>, dNTP, rTaq)

预混 9份  
90ul

Primer 1 10 mM: 0.25 ul

2.25ul

Primer 2 10 mM: 0.25 ul

2.25ul

ddH<sub>2</sub>O : 9.5 ul

85.5ul

预混在1.5ml的EP管中，充分混匀，离心，分到  
8个PCR管中，20ul/管，冰浴放置





## ■ 菌落PCR和常规PCR的比较

菌落PCR:

94°C 10min

94°C 40s

60°C 32s

72°C 90s

35 cycle

72°C 7min

4°C forever

常规PCR:

94°C 5min

94°C 40s

58°C 32s

72°C 90s

35~40 cycle

72°C 7min

4°C forever



- 前变性 $94^{\circ}\text{C}$ 时间延长为**10 min**，使得细菌能够充分破裂，DNA 大量释放并充分变性。
- 退火温度由  **$58^{\circ}\text{C}$**  提高到 **$60^{\circ}\text{C}$**  是由于原来引物中的酶切位点和保护碱基与待扩增的基因是不配对的，现在配对的数量增多，退火温度越高，特异性越强。
- 循环次数减少是因为25~35个循环的扩增量足够进行检测，如果量太大跑出的电泳条带呈现一型，不易确定分子量。



- 一般重组子克隆的PCR反应条带比较亮且宽，形状较规则，而假阳性和假阴性的PCR条带，多数不太亮，条带细而且不规则，有时拖尾

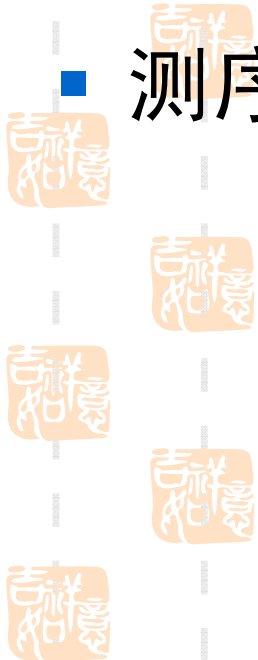


设阴性对照





- 菌落PCR完毕后电泳检测带型，在LB平板上挑选有正确带型的菌落。
- 阳性克隆提取质粒
- 酶切检测条带的分子量
- 测序，检查点突变（最可靠的方法）



MashiMaro MASHIMARO © by Kim Joo-ho, 2008  
www.mashimaro.co.kr

THANKS !

