



# 细菌转化实验

讲师：\*\*\*博士



# 目 录

质粒的转化

感受态细胞

细菌转化的基本原理

转化实验的基本步骤

疑难解析

# 01

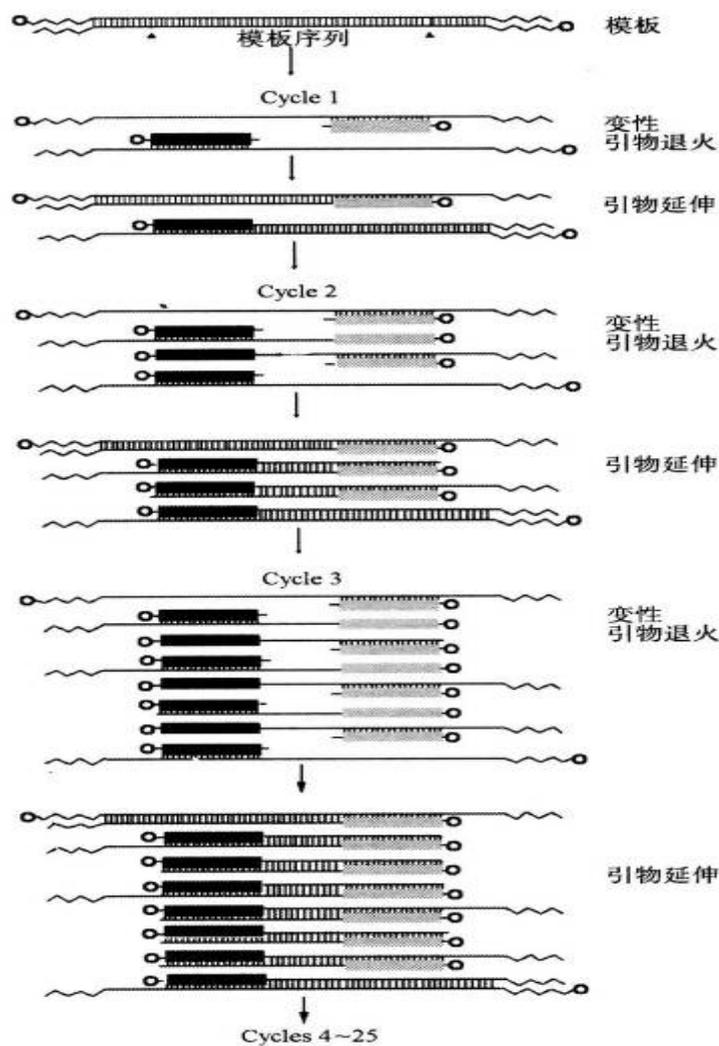
## 质粒的转化

- 1.1 质粒转化的目的
- 1.2 质粒转化的步骤
- 1.3 外源DNA片段与载体的连接重组
- 1.4 限制性酶切位点的特征
- 1.5 插入外源基因



- 1 放大某一基因片段，用于探针、基因功能检测等
- 2 携带目的基因的重组质粒在大肠杆菌中进行表达
- 3 PCR产物的克隆和测序
- 4 构建基因库、cDNA库
- 5 纯化基因片段

## 1.2. 质粒转化的步骤



外源DNA片段的获得



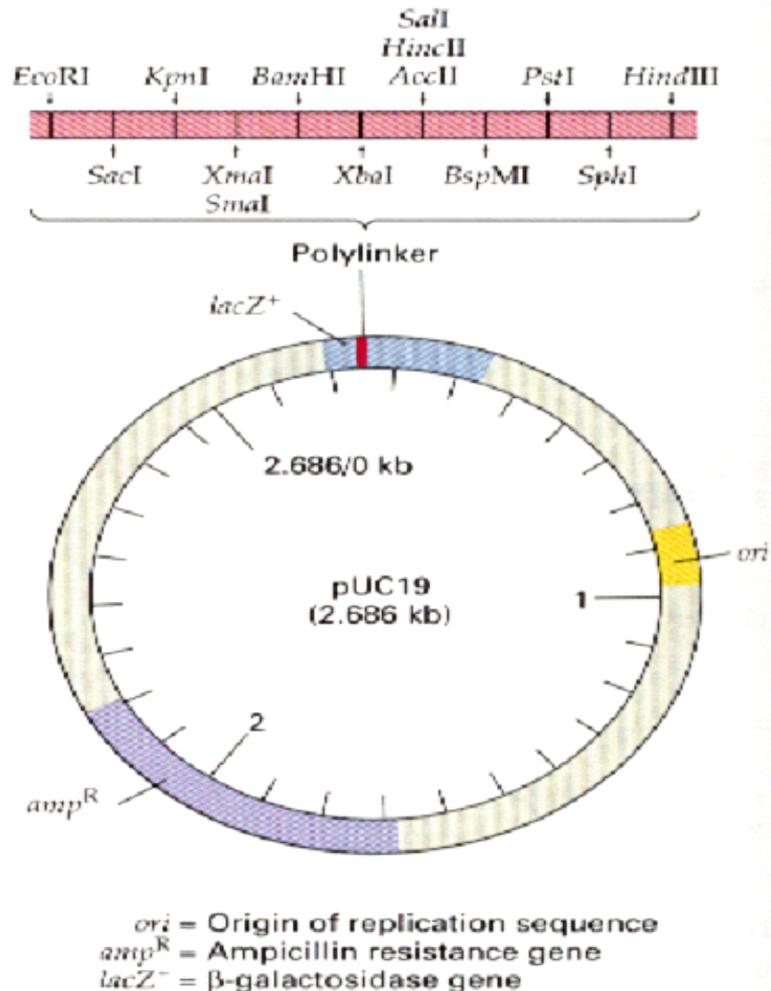
3种方式:

- ① PCR扩增出的基因组片段
- ② cDNA
- ③ 化学方法人工合成的DNA片段

### 1.3. 外源DNA片段与载体的连接重组

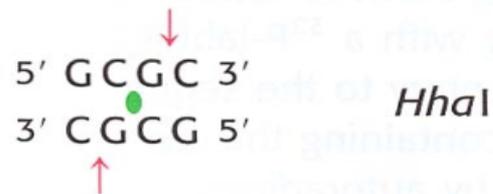
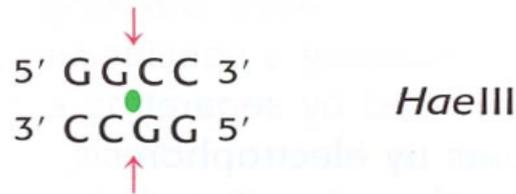
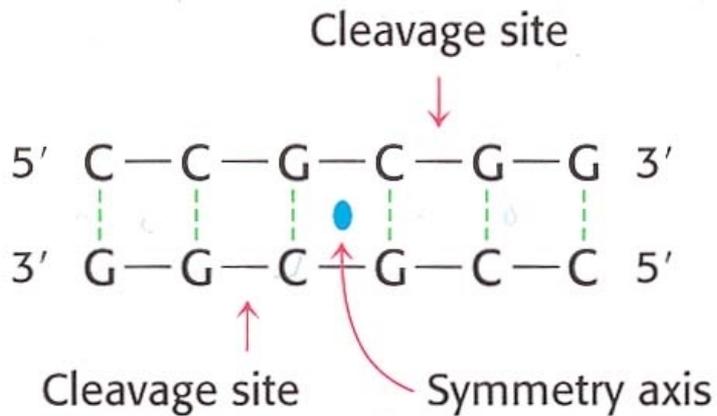
可采用由 *Hind* III 切割开的 pUC19 质粒，用 T4 噬菌体 DNA 连接酶将 PCR 片段与切割开的质粒 DNA 片段重新连接成一个环状的 DNA 分子，即把目的基因 DNA 插入质粒 DNA，实现了质粒重组。

pUC19 cloning vector



## 1.4. 限制性酶切位点的特征

- 限制性内切酶指能识别碱基构成特异的一段（4~8 bp）双链核酸序列，并从中将核酸的磷酸二酯键断裂的一种蛋白酶。
- 具有特异的识别核酸序列，称为酶切位点
- 所有的限制性内切酶切割DNA均产生含5' 磷酸基和3' 羟基基团的末端。



# 1.5 插入外源DNA

外源DNA和质粒是用同样的两个酶切，然后构建成含有外源基因的质粒

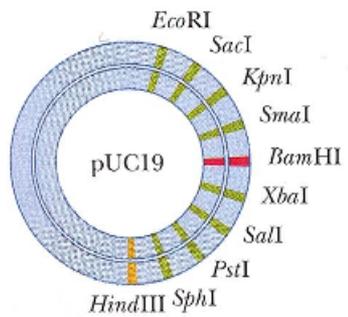
目标DNA



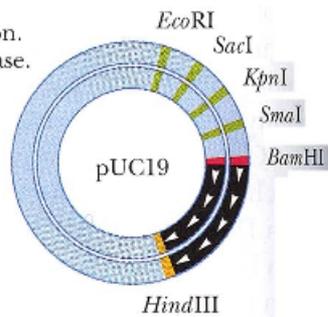
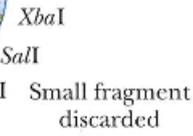
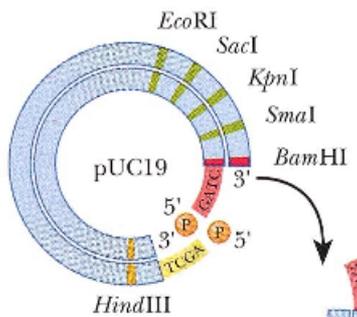
Digest with *Hind*III and *Bam*HI



Target DNA anneals with plasmid vector in only one orientation. Seal with T4 DNA ligase.



Digest with *Hind*III and *Bam*HI



质粒载体

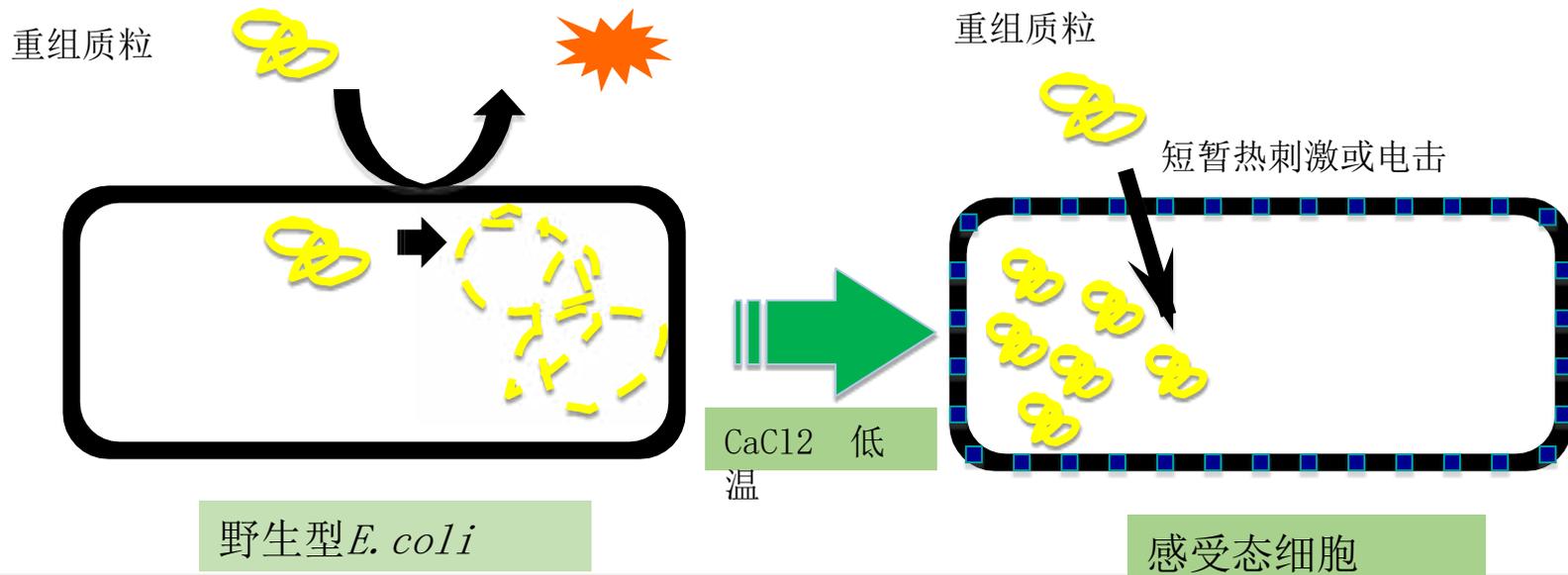
# 02

感受态细胞



## 2. 感受态细胞(Competent Cells)

野生型 *E. coli* 不容易转化，通过化学等特殊方法处理 *E. coli* 细胞，改变其膜对DNA的通透性，这种细胞就称为感受态细胞，即细胞处于能摄入核酸分子时的生理状态。



# 03

## 细菌转化的基本原理



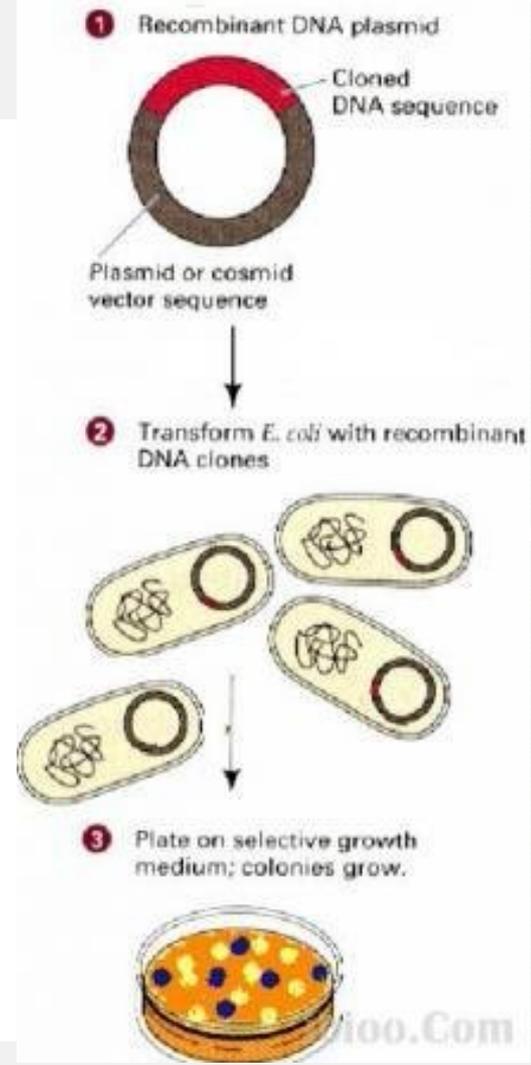
# 3. 细菌转化的基本原理

转化：是指将质粒导入细菌内，以扩增质粒或在细菌内表达质粒所携带的基因

转化方法

电击法

热激法



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/918140016127006065>