

## 實驗十一 勝任細胞製作

### 實驗目的

將大腸桿菌經氯化鈣處理過，形成勝任細胞，使其可以比較容易接受外來的質體 DNA，利用培養繁殖大腸桿菌，來大量複製質體 DNA。

### 實驗原理

當完成昨天修改質體 DNA 後，下一步動作即是將其轉入細胞內使其表現。同時也可大量培養後取回更大量的質體 DNA 存放，供進一步使用。質體 DNA 需藉由轉殖(transform)或又稱為轉形的技術，利用製成的勝任細胞，來將質體 DNA 引入。本實驗是用大腸桿菌來做為勝任細胞，藉由大腸桿菌的繁殖複製系統來達成複製質體 DNA 的目的。傳統的基因轉殖方法有氯化鈣法、微量注射法、電穿孔法與粒子轟擊植入法等。其中進行細菌轉形作用最常用也較簡單的一種方法是加入大量的氯化鈣，使用氯化鈣和冷凍離心機處理大腸桿菌，使大腸桿菌的細胞壁產生結構上的變化，變成勝任細胞，使細菌可以再熱休克(heat shock)的過程能較容易的接受外來的質體 DNA。

### 實驗步驟

#### A. 儀器用具

無菌操作台  
冷凍高速離心機  
50ml 離心管(需先滅菌)

#### B. 藥品試劑

MgCl<sub>2</sub> 100mM  
CaCl<sub>2</sub> 100mM  
E. coli DH5α 隔夜培養菌液

**C. 方法步驟**

注意事項:

1. 全程需要在冰上製作。
  2. 勝任細胞很脆弱，取出使用時要快、小心。
  3. 使用完離心機，要把溫度調回室溫，並且等其風乾，才可關機。
- 
1. 隔夜培養菌液取 1.5ml 加入 150ml 培養液中，37°C 振蕩培養(200rpm 或更快) 3hr~4hr。同時製作含有抗生素之培養皿：此處使用 Ampicillin，50µg/ml。(stock solution 為 50mg/ml)
  2. 培養好後，取出來冰浴 5 分鐘。
  3. 取出 25ml 菌液加入離心管離心集菌。設定轉速 6000rpm，溫度 4°C，時間 5 分鐘。
  4. 離心完，將離心管的上清液到掉，留下細菌沉澱物，加入 25ml 100mM 的 MgCl<sub>2</sub> 氯化鈣，並且將沉澱物利用微量滴管反覆吸取(pipetting)，來使沉澱物溶解在氯化鈣溶液中。
  5. 再放入離心機離心集菌，設定轉速 6000rpm，溫度 4°C，時間 5 分鐘。加入，緩和的 pipetting 混合。
  6. 重複第 4 步驟：去上清液，加入 25ml 100mM CaCl<sub>2</sub>，緩和的 pipetting 混合。
  7. 將試管放在冰上冰浴 20 分鐘。
  8. 再放入離心機離心集菌，設定轉速 3000rpm，溫度 4°C，時間 10 分鐘。
  9. 離心完，去上清液，加 1ml 100mM CaCl<sub>2</sub>，緩和的 pipetting 混合，完成製備。
  10. 若須存放，可與 50%甘油等量混合後存放-80°C，但放越久效率越差，因此最少 14 天內需使用。

**問題與討論**

1. 為何轉型需要使用 Ca<sup>2+</sup>離子來進行? 可以使用其他離子嗎?(無標準答案)
2. 欲將勝任細胞儲存時, 需要加上等量 50%甘油的理由何在? 為什麼?