



# 高效感受态细胞制备试剂盒

Cat.NO. ZC131

## 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	100 $\mu$ l $\times$ 100支	200 $\mu$ l $\times$ 100支
溶液A	4 $^{\circ}$ C	40ml	80ml
溶液B	4 $^{\circ}$ C	12ml	24ml

备注: 产品附带转化效率检测专用的0.1 ng/ $\mu$ l PUC19质粒一支。

储存: 产品短期4 $^{\circ}$ C保存, 长期-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。避免污染。

附带的PUC19质粒4 $^{\circ}$ C运输, -20 $^{\circ}$ C保存。

## 产品介绍:

1、高效感受态细胞制备试剂盒是在传统高效感受态细胞制备方法的基础上进行适当改良而成, 操作便捷, 转化效率高。

2、使用本试剂盒可以使感受态效率达到 $10^8$  cfu/ $\mu$ g质粒。对于小的质粒效率略高, 而对于大的质粒则效率略低一些。用本试剂盒制备的高效感受态细胞不仅可以转化质粒, 而且非常适合于转化普通的连接产物, 特别适合于转化平端连接等需要高转化效率的情况。

3、使用本试剂盒操作简单, 细菌培养好后仅需60分钟左右即可完成高效感受态细胞的制备。

4、本试剂盒适用于绝大部分常见的大肠杆菌, 包括Top 10、DH5 $\alpha$ 、BL21 ( DE3 )、JM109、TG1、HB101和XL-1等。但是不同的菌种, 转化效率可能有很大差别。

5、本试剂盒可以分多次使用, 共可以制备100支100 $\mu$ l的感受态细胞。

## 注意事项:

1、所有试剂、耗材、仪器、设备务必经过灭菌处理。

2、在制备感受态细胞的过程中均使用不含抗生素的SOB或LB培养基。在使用感受态菌的过程中热休克后的37 $^{\circ}$ C培养时也必须使用无抗生素的SOB或LB, 即便转入的质粒是有抗性的。

3、感受态细胞制备完毕请快速转入-70 $^{\circ}$ C。

4、细胞培养好后, 后续所有操作均须在4度或冰浴进行。

## 操作步骤: ( 实验前请先阅读注意事项 )

### 准备工作

• **配培养基:** ( 建议使用SOB培养基培养感受态细胞, 营养高于LB。配置时不加入Mg $^{+}$ 离子 ) 并灭菌, 置于37 $^{\circ}$ C 摇床 230转/分钟 过夜。

• **倒板:** ( 有相应抗性的加入适量抗性 )

• **涂板复苏菌株:** 为取得最佳的感受态效率, 必须先把甘油菌或其它形式保存的菌种涂LB平板, 并培养过夜。

**接种：**

取复苏菌种的LB平板，把镊子的顶端在70%酒精中蘸一下，并在酒精灯上略略烧一下，使镊子的顶端处于无菌状态。用镊子夹取一个无菌的塑料枪头或牙签，从平板上挑取一个长势优良的单克隆，然后把蘸有菌种的塑料枪头或牙签放到装有3毫升SOB或者LB（客户应该根据菌种不同选择适合的培养基）的细菌培养试管内。上述操作也可以使用接种环等进行操作。

吸取适量菌液，按1:200的比例接入培养基中，置于37°C摇床 230-250转/分钟 培养2小时-4小时（不同菌株，培养时间不同；培养基装量推荐为瓶总体积的五分之一，也就是500ml三角瓶装入100ml培养基。）

1) 在培养的细菌OD600达到0.5左右时，把培养的菌液置于冰浴中，冷却30分钟。

4°C（离心机必须预先冷却）2000-2500g离心10分钟收集细菌，弃上清（尽量去除干净上清，残留越少越好）。

**注意：**离心机转速和离心时间对于感受态细胞制作非常重要，不同种类的细菌最佳的转速和离心时间不同，应该根据具体情况优化。最佳状况是适当的转速和离心时间让细菌刚好离心沉淀下来，又不能太紧密，否则重悬困难，只能用力吹打才能重悬，会对细胞造成损害，影响转化效率。

2) 如果离心沉淀前的菌量为50毫升，按后续操作进行，如果是其它体积则按比例换算后进行后续操作。

3) 用10毫升预冷的高效感受态制备溶液A，置于小摇床 200转/分钟 2-3分钟（在冰浴条件下）重悬细菌沉淀（也可用移液枪吹打重悬，操作一定要很轻柔，否则会影响效果）。

4) 冰浴条件下静置15分钟。

5) 4°C（离心机必须预先冷却）2000-2500g离心10分钟收集细菌，弃上清。

6) 用4毫升预冷的高效感受态制备溶液B轻轻重悬细菌沉淀。吹打重悬时一定要很轻柔，否则会严重影响效果。

7) 冰浴上进行分装，可以根据需要适当分装成50-200微升/管。

8) 立即使用或用液氮或乙醇干冰浴速冻后-70°C保存。

**质量检测：**

• **无杂菌检测：**针对您的实验要求，在相应的抗性板中涂布感受态细胞。

• **转化效率检测：**

1. 取100 μl转入1 μl 0.1ng/μl 的pUC19质粒，冰上静置30 min；

2. 42°C准确热激60s，冰上静置2-3 min，加入500 μl 无抗生素的SOC培养基（或者LB培养基），37°C 250 rpm摇菌1 h；

3. 再加入400ul无抗生素的SOC培养基（或者LB培养基）吹吸混匀培养后的菌体，取100 μl菌液全部涂于氨苄抗性的LB平板上；

4. 37°C过夜培养，观察和统计转化了pUC19质粒的平板上的单克隆数目，经过换算，得到转化效率。

转化效率=长出的克隆数×稀释倍数/DNA的浓度（μg）