

超级感受态细菌制备试剂盒

产品编号: MA0661

规格: 100T/盒

产品内容

产品组成	MA0661-1
超级感受态细菌培养液	125mL
超级感受态制备试剂 A	50mL
超级感受态制备试剂 B	5mL
说明书	1 份

产品简介

超级感受态细菌制备试剂盒是一种专门用于构建各类高转化效率大肠杆菌的试剂盒。本试剂盒可快速培养目标菌株,并通过理化方法诱导细菌成为高效感受态细菌。制备好的感受态细菌处于最适摄取和容纳外来 DNA 的生理状态,使细菌具有摄取外源 DNA 并使其基因型和表现型发生相应变化的能力,成为容易受质粒 DNA 转化的细菌。

本试剂盒可转化质粒及普通的连接产物,转化大质粒同样具有高效率。本试剂盒感受态效率可达 10^8 - 10^9 cfu/ μ g 质粒。本试剂盒同时提供了专门用于制备超级感受态的特殊细菌培养液,该培养基能够极大提高感受态菌的转化效率,在提高菌类培养速度的同时减少实验时间。本试剂盒使用操作简单,细菌培养好后仅需 60 分钟即可完成超级感受态细菌的制备。

本试剂盒适用于绝大部分常见的大肠杆菌,涵盖质粒保存菌株 DH5 α 、Top 10; 蛋白表达菌株 BL21(DE3)、Rosseta(DE3)、BL21 Condon Plus(DE3)、BL21(DE3)pLysS 和 BL21 Star(DE3)等,制备的菌株可广泛应用于分子克隆、基因工程、合成生物学等研究领域,帮助科研人员更高效地完成实验。

使用方法

(一) 平板活化菌株:

取出一支冻存菌株于超净台中,用无菌的接种环轻轻蘸取菌种后(此步也可用枪头蘸取),将目标菌种划线于 LB 平板上活化,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 12-18 小时,得到活化平板(长出大小合适的单菌落即可)。

(二) 接种活化菌株:

在超净台中,用灼烧并冷却后的镊子夹取一个塑料枪头(或者灭过菌的牙签)。在超净台中挑取活化平板中的单克隆,然后把蘸有菌种的塑料枪头或牙签接种于 3-5mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 下 220 rpm 振荡培养 12-16 小时左右(不宜超过 18 小时),得到过夜活化菌液。



（三）菌液培养：

在超净台中，按照 1:500 的比例将过夜活化菌液接种于超级感受态细菌培养液中（例：0.1mL 过夜活化菌液接种于 50mL 超级感受态细菌培养液中），37℃ 220 rpm 振荡培养 2.5-3.5 小时。培养 2.5 小时后测试 OD600 吸光光度值，直到 OD600 在 0.6-0.7 之间（0.65 为宜）方可停止培养开始制备流程。

（四）制备感受态细菌（所有环节均需超净台及冰浴中进行）：

1. 把培养的菌液置于冰上冰浴 10 分钟。同时将离心机预冷至 4℃ 待用，超级感受态制备试剂 A、超级感受态制备试剂 B 在冰上预冷备用。

2. 将菌液转移至离心机上 4000g 离心 5min，在超净台中将离心后的菌倒去上层的超级感受态细菌培养液（倒去培养基后可倒扣离心管充分沥干，沥干时间不要超过 1 分钟）。

3. 以 5:2 的比例向菌液沉淀中加入预冷好的超级感受态制备试剂 A（例：离心前 50mL 菌液，则加入 20mL 超级感受态制备试剂 A），轻柔重悬菌液沉淀（可将离心管平放于冰上，顺时针轻轻交替旋转离心管）。待沉淀完全重悬好后（无可见菌块），冰上预冷 15 分钟。

4. 将菌液转移至离心机上 4000g 离心 5min，在超净台中将离心后的菌倒去上层的超级感受态细菌培养液（倒去培养基后可倒扣离心管充分沥干，沥干时间不要超过 1 分钟）。

5. 以 10:1 的比例向菌液沉淀中加入预冷好的超级感受态制备试剂 B（例：离心前 20mL 菌液，则加入 2mL 超级感受态制备试剂 B），轻柔重悬菌液沉淀（可将离心管平放于冰上，抓住管口顺时针轻轻交替旋转）。待沉淀完全重悬好后（无可见菌块），冰上预冷 15 分钟。

6. 在冰浴上进行分装，可以根据需要适当分装成 50-200μL/管。（为保证感受态效率，分装 EP 管建议提前置于 -80℃ 预冷）。

7. 分装后立即使用液氮速冻，成品 -80℃ 保存。-80℃ 保存的感受态细菌可保持六个月高转化效率。（分装时注意动作要快，且全程在冰上操作，感受态随时间的变化，其效率会在分装到最后略有下降）。

（五）感受态转化：

1. 从 -80℃ 冰箱中取出一管感受态细菌放入提前准备好的冰盒中，冰上融化。（对于新鲜制备的感受态可直接使用）。

2. 在超净台中打开感受态细菌，向其中加入 1-100ng 质粒，使用移液枪轻轻混匀。如果检测感受态细菌的效率，加入 10pg-1ng 质粒，但质粒的体积不宜超过感受态细菌量的 10%。如果转化连接产物，每 50μL 感受态细菌加入 2-10μL 连接产物。

3. 将感受态细菌-质粒混合物置于冰上 30min，期间每隔 10min 轻弹几下 EP 管，使细菌和质粒充分混匀。

4. 将感受态细菌-质粒混合物放入预热好的水浴锅中，42℃ 热激 90s，再置于冰上 5min。



5. 向 EP 管中加入 500 μ L LB 培养基，使用移液枪轻轻吹打混匀，37 $^{\circ}$ C，200rpm 震荡培养 1h。

6. 若检测感受态细菌的转化效率，取 100 μ L 的细菌悬液涂布到含有相应抗生素的 LB 平板上进行鉴定。如果转化的产物为连接产物，则需要以 2000-3000g 的离心力离心 1 分钟或更长时间，以确保细菌充分沉淀，去除约 400-450 μ L 体积的 LB 培养液。使用剩余的 LB 培养液（约 50-100 μ L）重悬细菌沉淀，并将重悬后的细菌全部涂布到含有适当抗生素的 LB 平板上。最后，将平板置于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

（六）质粒快速转化法：

1. 向 50-100 μ L 融解的感受态细菌中加入 1-100ng 的质粒（质粒的体积不宜超过感受态细菌量的 10%），并轻轻弹动离心管以混匀。

2. 将混合液在冰浴或冰水中静置 10 分钟，以促进质粒的摄取。

3. 将全部菌液涂布到含有适当抗生素的 LB 平板上，并在 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜。

保存条件

-20 $^{\circ}$ C 保存，自生产之日起 12 个月有效。

注意事项

1. 为保证感受态效率，感受态细菌制备过程中请勿使用抗生素。
2. 为保证感受态制备效果，制备全程都要在无菌、低温条件下操作。制备操作尽量要快。
3. 产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。产品应避免接触皮肤和眼睛，如不慎接触，应立即用大量清水冲洗。

Y241201

