

使用说明书

GeneCopoeia™
Expressway to Discovery

GeneCopoeia Inc.
19520 Amaranth Drive
Germantown, Maryland 20874, USA
Tel (China): 4006-020-200
Web: www.genecopoeia.com
www.igenebio.com

一步法高效感受态细胞制备试剂盒

产品套装编号	U0201A / U0201B	
产品成分	包装规格	
Solution A	1 ml (U0201A) / 10 ml (U0201B)	
Solution B	1 ml (U0201A) / 10 ml (U0201B)	
pUC19(10 pg/μl)	50 μl	

储存和运输条件: 常温运输, 4°C 冷藏, -20°C 长期保存, 可反复冻融。

■ 产品概述

本试剂盒是在制备高效感受态细胞的标准方法上结合了一步法制备感受态细胞的方法, 既可以一步制备超高效的感受态细胞, 又可将常态细胞 (包括新鲜培养的菌液、新鲜的或 4°C 放置数月的培养基菌落、甘油菌种保存液等) 快速制备成感受态细胞。

■ 产品特点

一步超高效感受态细胞制备方法	快速感受态细胞制备方法(细胞转化液)
<p>1. 转化率高: 所制备的感受态细胞转化率可达 10^9 cfu/μg pUC19 DNA (转化效率根据大肠杆菌细胞系及转化用 DNA 不同稍有差异)。</p> <p>2. 操作简单: 只需离心一次即可完成感受态细胞的制备。</p> <p>3. 产率高: 制备的感受态细胞数量比普通方法多一倍。</p> <p>4. 稳定性好: 所制细胞在 -80°C 保存一年以上, 其转化率几乎不会降低。</p>	<p>1. 转化率适中: 使用 10 ng 质粒转化一般能得到上万个转化子, 效率在 10^5 到 10^7 cfu/μg 质粒之间。</p> <p>2. 操作简单快捷: 不需专门制备感受态细胞, 可直接使用常态细胞进行质粒转化, 随用随配, 整个操作过程在一个 1.5ml 离心管中即可完成。</p> <p>3. 设备要求低: 无需冷冻离心机和恒温摇床, 菌种无需过夜培养, 最短只需 1 小时培养时间。</p>

- **重复性好:** 可以多次冻融使用 (试剂盒储存于 -20°C, 可以常温运输)
- **应用广泛:** 适用于几乎所有常用的大肠杆菌

■ 用户需准备的试剂 (相关配置见附录)

S.O.B 培养基 (含有 20 mM Mg^{2+})
液氮或者乙醇干冰
S.O.C 培养基
LB 平板 (含有抗生素)

■ 用户需准备的设备

温控摇床
离心机 (大量制备需冷冻离心机)
超净工作台
水浴锅
分光光度计 (可见光)

■ 感受态细胞制备操作流程

方法一：一步超高效感受态细胞制备方法

1. 接种

从-80°C 冰箱中取出冻存的甘油菌，直接挑取部分菌液（无需解冻）接种于含 100 ml S.O.B 培养基（含相应抗生素）的 500 ml 三角瓶中，也可挑取已经划线纯化的新鲜单菌落接种于 S.O.B 培养基中，或者将已隔夜摇好的母液按照 1:100 比例接种于 S.O.B 培养基中，以上三种接种方法可以根据需要自主选择（直接从冻存的细菌原种接种培养的细菌，所得到的转化效率高于使用连续传代、4°C 或室温贮存的培养物）。

2. 菌体培养

18°C-37°C（根据实验需要，一般在室温约 25°C 过夜培养），约 200-250 rpm/min 震荡培养，OD 600 值达到约 0.3 时停止培养，准备制备细胞。

3. 感受态细胞制备

1). 小量制备方案（可不需冷冻离心机）

- 取菌体培养液 1.2 ml 于已灭菌的预冷 1.5 ml 离心管中（根据需要量确定离心管的数量）；
- 冰浴 10 分钟，微型离心机 10000 rpm/min 离心 30-60 秒，弃上清（注意尽量除尽上清）；
- 加入预冷的 100 μ l Solution A 和 100 μ l Solution B，用枪头轻柔重悬菌体，冰浴 10 分钟；
- 感受态细胞制作完成，冰上分装（100 μ l/管）；分装后建议以液氮或乙醇干冰速冻，提高转化率。

2). 大量制备方案（需要冷冻离心机）

- 取菌体培养液 50 ml 于已灭菌的预冷离心管中（根据需要量确定离心管的大小）；
- 冰浴 10 分钟，4°C，4000 rpm/min 离心 10 分钟，弃上清（注意尽量除尽上清）；
- 加入预冷的 4 ml Solution A 和 4 ml Solution B，轻轻重悬菌体，冰浴 10 分钟；
- 感受态细胞制作完成，冰上分装（100 μ l/管）；可立即使用，也可分装后以液氮或乙醇干冰速冻，-80°C 冰箱保存。

方法二：快速制备感受态细胞方法（细胞转化液）：

- 取 1 ml S.O.C 于已灭菌的 1.5 ml 离心管中，挑取划线纯化的单菌落或几个菌落（或者冻存的甘油菌）接种于培养基中；
- 37°C 温浴约 2 小时（具体时间根据菌株和接种量而定）；
- 冰浴 10 分钟，微型离心机 10000 rpm/min 离心 30-60 秒，弃上清（注意尽量除尽上清）；
- 加入预冷的 50 μ l Solution A 和 50 μ l Solution B，用枪头轻柔重悬菌体，冰浴 10 分钟；
- 感受态细胞制作完成；分装后建议以液氮或乙醇干冰速冻，提高转化率。

■ 感受态细胞的 DNA 转化

- 取感受态细胞，冰浴解冻；
- 把 50-100 μ l 感受态细胞移至灭菌处理的试管内；
- 加入用于转化的 DNA 或反应产物（同时以 pUC19 质粒设置一阳性对照和空白对照）；
- 冰浴 30 分钟；
- 42°C 温浴 30 秒；
- 冰浴 2-3 分钟；
- 加入 37°C 预温的 S.O.C 培养基（如使用 LB 培养基将降低转化率），使终体积为 1 ml；
- 37°C 振荡培养 1 小时（160-225 rpm/min）；
- 取适量涂布琼脂平板培养基；
- 37°C 过夜培养。

■ 实验示例

使用本试剂盒按照一步超高效法大量制备 *E.coli* DH5 α 感受态细胞，使用 pUC19 质粒 10 μg 转化至 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中（同时用灭菌水代替质粒设置阴性对照），在含有 Amp 抗性的 LB 琼脂平板培养基上形成单菌落，计算菌落数及转化率，见下表。

实验例	涂板量	菌落数		转化率	
		无速冻	速冻后	无速冻	速冻后
A	100	68	1006	6.8×10^7	1.0×10^9
	200	150	1500	7.5×10^7	7.5×10^8
B	100	96	809	9.6×10^7	8.1×10^8
	200	178	2800	8.9×10^7	1.4×10^9
C	100	64	1850	6.4×10^7	1.9×10^9
	200	130	3612	6.5×10^7	1.8×10^9
平均转化率				7.6×10^7	1.3×10^9

空白对照：在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 50 小时，没有菌落产生。

■ 注意事项

1. 本试剂盒成分中含有甘油，制备的细胞最好存放在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中；
2. 试剂盒 Solution 分为 A、B 两管，解冻后等体积混合使用；
3. Solution A 和 Solution B 混合后要尽快使用，如有剩余可以 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，保存时间不超过 15 天；
4. 感受态细胞制备好后需在干冰上分装（分装后用液氮速冻可提高转化率）；
5. 20~32 $^{\circ}\text{C}$ 室温培养细菌，可获得更高的转化率 ($>10^9$ cfu/ μg DNA)；
6. 为提高转化率，本试剂盒推荐使用含有 10 mM MgCl_2 和 10 mM MgSO_4 的 S.O.B 培养基，即培养基的 Mg^{2+} 浓度为 20 mM；
7. 采用超高效感受态细胞制备方法最终获得感受态细胞的体积一般是培养菌液体积的 1/6，而快速制备时为 1/10；
8. 本试剂盒适用于多种菌株，例如：DH1、DH5、DH5 α 、DH10、DH10B、HB101、RR1、JV30、DH11S、DM1、DH10B/p3、SCS1、Stbl-2、Stbl-3、DH12S、XL1-Blue、SURE Strain、SURE 2 Strain、AG1、XL2-Blue、JM101、JM109、JM110/SCS110、NM522、TOPP Strains、ABLE Strains、XL1-Red、BL21、BL21-gold、BLR(DE3)plysS、Rosrtta(DE3)、Rosrtta(gami)。

附录：相关培养基配方

■ LB 培养基

1. 培养基成分

组分名称	浓度 (W/V)
Trytone	1%
Yeast extract	0.5%
NaCl	1%

2. 配制方法（以配制 1L 培养基为例）

① 称取下列试剂，置于适当体积容器中；

组分名称	称取重量 (g)
Trytone	10
Yeast extract	5
NaCl	10

② 加入约 800 ml 去离子水，充分搅拌溶解；

③ 调节 pH 值至 7.0；

④ 继续添加去离子水，将培养基定容至 1 L；

⑤ 高压蒸汽灭菌 20 分钟，4℃ 保存。

■ SOB 培养基

1. 培养基成分

组分名称	浓度
Tryptone	2% (W/V)
Yeast Extract	0.5% (W/V)
NaCl	0.05% (W/V)
KCl	2.5 mM
Mg²⁺	20 mM

2. 配制方法（以配制 1L 培养基为例）

① 称取下列试剂，置于适当体积容器中；

组分名称	称取重量 (g)
Tryptone	20
Yeast Extract	5
NaCl	0.5

② 加入约 800 ml 的去离子水，充分搅拌溶解；

③ 配制 250 mM KCl 溶液：称取 1.86 g KCl，溶解在 90 ml 去离子水中，定容至 100 ml；

④ 配制 2 M MgCl₂ 溶液：称取 19 g MgCl₂，溶解在 90 ml 去离子水中，定容至 100 ml；

⑤ 配制 2 M MgSO₄ 溶液：称取 24 g MgSO₄，溶解在 90 ml 去离子水中，定容至 100 ml；

⑥ 量取 10 ml 250 mM KCl 溶液并加入到上述步骤 2 配置的溶液中，搅拌均匀；

⑦ 用 NaOH 调节 pH 值至 7.0，并加去离子水将培养基定容至 1 L；

⑧ 高压蒸汽灭菌 20 分钟后，4℃ 保存；

⑨ 使用前加入 5 ml 灭菌的 2 M MgCl₂ 溶液、5 ml 灭菌的 2 M MgSO₄ 溶液。

SOC 培养基

SOC 培养基除含有 20 mM 的葡萄糖外，其他成分与 S.O.B 培养基相同。S.O.B 培养基高压灭菌后，再加入过滤除菌的葡萄糖即可。

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司不承担任何责任。



地址：广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼，510663

客服电话：020-28069233 电子信箱：support@igenebio.com 网址：www.igenebio.com