



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
订货热线: 400-1683301或800-8283301  
订货e-mail: order@beyotime.com  
技术咨询: info@beyotime.com  
网址: http://www.beyotime.com

## 一步法感受态细菌制备试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0301	一步法感受态细菌制备试剂盒	200次

### 产品简介:

- 碧云天生产的一步法感受态细菌制备试剂盒 (One Step Competent Cell Preparation Kit) 是一种用于大肠杆菌感受态细菌快速制备的试剂盒。一步法感受态细菌制备试剂盒是在经典的TSS法的基础上进行适当改良而成, 既继承了TSS法的快速和简便, 又在此基础上提高了感受态细菌的转化效率和易操作性。使用本试剂盒可以使感受态效率达到 $10^6$ 以上。不仅可以转化质粒, 而且可以转化普通的连接产物。另外, 对细菌的培养条件要求比较宽松, 培养的细菌只要处于对数期内就可以使用本试剂盒制备感受态细菌。
- 使用本试剂盒操作非常简单, 细菌培养好后仅需十几分钟就可以完成感受态细菌的制备。
- 本试剂盒适用于绝大部分常见的大肠杆菌, 包括DH5 $\alpha$ 、JM109、TG1、HB101和XL-1等。对于一些用于蛋白表达或病毒质粒构建的特殊大肠杆菌也适用, 制备出来的感受态菌转化质粒肯定没有问题, 但如果转化连接产物有时效果不如DH5 $\alpha$ 等其它常见的细菌。
- 本试剂盒提供了DH5 $\alpha$ 甘油菌作为菌种, 可以用于制备感受态细菌。
- 本试剂盒可以分多次使用, 共可以制备足够进行200-400次转化的感受态细菌。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0301-1	感受态制备试剂	10ml
D0301-2	DH5 $\alpha$ 甘油菌	200 $\mu$ l
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。

### 注意事项:

- 需自行配制LB液体培养基和LB平板以用于细菌的培养和感受态效率的检测。
- 尽管经过我们的测试凡是处于对数期内的细菌都可以用于感受态细菌的制备, 但如果细菌生长的OD<sub>600</sub>的值达到0.3-0.5左右时, 制备出来的感受态效果最佳。
- 在制备感受态细菌的过程中均使用不含抗生素的LB。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LB, 即便转入的质粒是有抗性的。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明:

#### 1. 涂平板:

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。

#### 2. 接种:

取一有新鲜培养的菌种的LB平板, 后续操作均在超净台内进行。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LB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。

#### 3. 培养:

37 $^{\circ}$ C约200rpm培养过夜, 通常培养时间控制在16小时左右为宜。绝对不宜超过18小时。

#### 4. 再接种培养:

根据需要制备的感受态细菌的量, 按照1:100的比例用新鲜培养的过夜菌接种培养。例如取500微升的新鲜过夜菌到50毫升的LB中继续37 $^{\circ}$ C约200rpm培养。通常在大约培养2-2.5小时后OD<sub>600</sub>可以达到0.3-0.5。

#### 5. 制备感受态细菌:

在培养的细菌OD<sub>600</sub>达到0.3-0.5时, 4 $^{\circ}$ C2000g离心5分钟收集细菌。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。用5毫升预冷的LB重新悬浮起细菌沉淀, 加入5毫升在冰浴或冰水浴上融解的感受态制备

试剂，混匀，冰浴放置5分钟。然后再轻轻混匀，根据实验需要适当分装到1.5毫升或0.5毫升的离心管内后-70°C保存。

注：如果以后只会做单管的转化，可以分装成每管最少50微升或100微升，如果以后一次性做多个转化，可以每管分装500微升或更大体积。-70°C保存后，感受态的效率会随着时间的推移逐渐下降，但通常在半年内使用转化效率下降不会太多。总的来说，新鲜制备的感受态要比冻存的感受态转化效率更高一些。

#### 6. 感受态细菌的使用：

a. 对于感受态细菌效率的测定或连接产物的转化(其它如基因突变产物的转化等参考连接产物进行)：

- (a) 在冰上缓慢融解感受态细菌(对于新鲜制备的感受态就可以直接使用了)，如果检测感受态细菌的效率，加入100pg-10ng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100微升感受态细菌加入10微升连接产物。
- (b) 轻轻用手指弹动离心管，以混匀细菌和质粒或连接产物。冰浴或冰水浴放置30分钟。
- (c) 42°C水浴，热休克2分钟。
- (d) 热休克后立即置于冰水浴中，2分钟。
- (e) 加入900微升LB，37°C200rpm培养1小时。
- (f) 如果检测感受态效率，取100微升涂布到含有相应抗生素的LB平板上。如果转化的是连接产物，2000-3000g离心1分钟或更长时间使细菌充分沉淀下来。去除约900-950微升LB培养液。细菌沉淀用余下的LB培养液重悬，然后全部涂布到含有适当抗生素的LB平板上。37°C培养过夜。

b. 对于质粒的转化：

- (a) 融解感受态细菌，加入不少于50ng质粒到50或100微升感受态细菌中。质粒的量可以是1微克或更多，但体积不宜超过感受态细菌量的10%。
- (b) 轻轻用手指弹动离心管，以混匀细菌和质粒。冰浴或冰水浴放置10分钟。
- (c) 取全部菌液直接涂布到含有适当抗生素的LB平板上，37°C培养过夜。

Version 2016.11.11