



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ 高效感受态细胞制备试剂盒
 - ◆ 目录号 **CC08**
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

高效感受态细胞制备试剂盒

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	100 μ l \times 100 支
溶液 A	4 $^{\circ}$ C	100ml
溶液 B	4 $^{\circ}$ C	10ml

短期使用 4 $^{\circ}$ C，避免污染。长期保存-20 $^{\circ}$ C一年有效。

❖ 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 10⁸ cfu/ μ 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 α 、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 μ 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 LB。在使用感受态菌的过程中热休克后的 37℃ 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。
3. 感受态细胞制备完毕请快速转入-70℃。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

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 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。

3. 培养：

37℃ 约 250rpm 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：

根据需要制备的高效感受态细胞的量，按照 1:500 的比例用新鲜培养过夜菌接种培养。例如取 100 微升的新鲜过夜菌到 50 毫升 SOB 或者 LB 中，37℃ 约 250rpm 培养。



5. 制备感受态细胞:

⇒ **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。

- 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 15 分钟。
注意: 后续所有操作均须在 4 度或冰浴进行。
- 2) 4℃ (离心机必须预先冷却) 3000-3500g 离心 5 分钟收集细菌, 弃上清 (尽量去除干净上清, 残留越少越好)。
- 3) 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。
- 4) 用 20 毫升预冷的高效感受态制备溶液 A 轻轻重悬细菌沉淀 (为方便重悬, 可先加少量溶液 A, 重悬后再加入剩余的溶液 A), 吹打重悬时一定要很轻柔, 否则会影响效果。
- 5) 冰浴 15 分钟。
- 6) 4℃ (离心机必须预先冷却) 3000-3500g 离心 5-7 分钟收集细菌, 弃上清。
- 7) 用 2 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, 否则会影响效果。
- 8) 冰浴 15 分钟。
- 9) 冰浴上进行分装, 可以根据需要适当分装成 50-200 微升/管。
- 10) 立即使用或用液氮或乙醇干冰浴速冻后-70℃保存。