

TransEasy™超高效感受态细胞制备试剂盒

产品套装编号: U0201A / U0201B / U0201C		
产品成分	包装规格	储存条件
Solution A	1×1ml	-20°C保存。
	1×10ml	
	1×50ml	
Solution B	1×1ml	-20°C保存。
	1×10ml	
	1×50ml	
pUC19(10 pg/μl)	1×50μl	-20°C保存。

■ 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，又可把常态细胞（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)
<ol style="list-style-type: none"> 转化率高：所制备的感受态细胞转化率可达10⁹cfu/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）。 操作简单：只需离心一次即可完成感受态细胞的制备。 产率高：制备的感受态细胞数量比普通方法多一倍。 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。 	<ol style="list-style-type: none"> 转化率适中：使用10ng质粒转化一般能得到上万个转化子，效率在10⁶到10⁷cfu/μg质粒之间。 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。 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。

■ 用户需准备的试剂（相关配置见附录）

- S.O.B培养基（含有20mM Mg²⁺）
- 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100ml S.O.B培养基（含相应抗生素）的500ml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25°C左右过夜培养），200~250rpm左右震荡培养，直至OD600值达到0.3左右时停止培养，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）

- A. 取菌体培养液1.2ml于预冷的已灭菌1.5ml离心管中（根据需求量确定离心管的数量）。
- B. 冰浴10min，微型离心机10000rpm离心30~60s，弃上清（注意尽量除尽上清）。
- C. 加入预冷的100ul Solution A和100ul Solution B，轻轻重悬菌体（用枪头混匀即可），冰浴10min。
- D. 细胞制作完成，冰上分装，100ul/管（分装后最好液氮或乙醇干冰速冻，可提高转化率）。

2). 大量制备方案（必需冷冻离心机）

- A. 取菌体培养液50 ml于预冷的灭菌离心管中（根据需求量确定离心管的大小）。
- B. 冰浴10min，4°C，4000rpm离心10min，弃上清（注意尽量除尽上清）。
- C. 加入预冷的4ml Solution A和4ml Solution B，轻轻重悬菌体，冰浴10min。
- D. 细胞制作完成，冰上分装，100ul/管。
- E. 可立即使用，也可用液氮或乙醇干冰速冻后-80°C冰箱保存。

方法二：快速制备细胞方法（细胞转化液）

- 取1ml S.O.C于已灭菌的1.5ml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2h左右（根据菌株和接种量而定）。
- 冰浴10min，微型离心机10000rpm离心30~60s，弃上清（注意尽量除尽上清）。
- 加入预冷的50ul Solution A和50ul Solution B，轻轻重悬菌体（用枪头混匀即可），冰浴10min。
- 感受态细胞制作完成（此时最好液氮或乙醇干冰浴速冻，可提高转化率）。

■ 感受态细胞的DNA转化操作流程

- 把感受态细胞置于冰中解冻。
- 把50~100μl的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质粒设置一对对照和空白对照）。
- 冰浴30min。
- 42°C温浴30s。
- 冰浴2~3min。
- 加入37°C预温好的S.O.C培养基（如用LB培养基将降低转化率），使终体积为1ml。
- 37°C振荡培养1h（160~225rpm）。
- 取适量菌液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* DH5α感受态细胞，使用pUC19质粒10pg转化至*E.coli* DH5α感受态细胞中（同时用灭菌水代替质粒做空白对照实验），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	6.8x10 ⁷	1.0x10 ⁹
	200	150	1500	7.5x10 ⁷	7.5x10 ⁸
B	100	96	809	9.6x10 ⁷	8.1x10 ⁸
	200	178	2800	8.9x10 ⁷	1.4x10 ⁹
C	100	64	1850	6.4x10 ⁷	1.9x10 ⁹
	200	130	3612	6.5x10 ⁷	1.8x10 ⁹
平均转化率				7.6x10 ⁷	1.3x10 ⁹

空白对照：在37°C培养箱中培养50h设有菌落产生。

■ 注意事项

- 本试剂盒成分中含有甘油，制备的细胞最好存放在-80°C冰箱中。
- 试剂盒分为A、B两管，解冻后等体积混合使用。
- 溶液A和溶液B混合后要尽快使用，如有剩余可以4°C保存，不要超过15d。

- 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）。
- 20~32°C室温培养细菌，可获得更高的转化率(>10⁹cfu/μg DNA)。
- 为提高转化率，本试剂盒推荐使用含有10mM MgCl₂和10mM MgSO₄的S.O.B培养基，即培养基的Mg²⁺浓度为20mM。
- 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。
- 本试剂盒适用于多种菌株，例如：DH1、DH5、DH5α、DH10、DH10B、HB101、RR1、JV30、DH11S、DM1、DH10B/p3、SCS1、Stbl-2、Stbl-3、DH12S、XL1-Blue、SURE Strain、SURE 2 Strain、XL2-Blue、AG1、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

- 培养基成分

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

- 配制方法（以配置1L培养基为例）
 - 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

- 加入约800ml的去离子水，充分搅拌溶解。
- 调节pH值至7.0。
- 加去离子水将培养基定容至1L。
- 高压蒸汽灭菌20min，4°C保存。

■ S.O.B培养基

- 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
Mg ²⁺	20 mM

- 配制方法（以配置1L培养基为例）
 - 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

- 加入约800ml的去离子水，充分搅拌溶解。
- 配制250mM KCl溶液，称取1.86g KCl后溶解在90ml去离子水中，定容至100ml。
- 配制2M MgCl₂溶液，称取19g MgCl₂后溶解在90ml去离子水中，定容至100ml。
- 配制2M MgSO₄溶液，称取24g MgSO₄分别溶解在90ml去离子水中，定容至100ml。
- 量取10ml 250mM KCl溶液并加入到上述步骤2配置的溶液中，搅拌均匀。
- 用NaOH调节pH值至7.0，并加去离子水将培养基定容至1L。
- 高压蒸汽灭菌20min后，4°C保存。
- 使用前加入5ml灭菌的2M MgCl₂溶液，和5ml灭菌的2M MgSO₄溶液。

■ S.O.C培养基

S.O.C培养基除含有20mM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。



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D区8楼，510663
 电话：4006-020-200；020-32068595
 传真：020-32052877
 网址：www.genecopoeia.com.cn