

### 大肠杆菌感受态制作试剂盒说明书

#### ● 产品规格和内容:

包装名称	货号	包装含量	保存条件/时间
大肠杆菌	CAT#: ECK1010S	W1:50ml (1 瓶) ; ST:25ml (1 瓶) ; pUC19 (10pg/μl 1 支)	4°C/-20°C/24 个月
感受态制	CAT#: ECK1010M	W1:100ml (1 瓶) ; ST:50ml (1 瓶) ; pUC19 (10pg/μl 1 支)	4°C/-20°C/24 个月
作试剂盒	CAT#: ECK1010L	W1:500ml (1 瓶) ; ST:250ml (1 瓶) ; pUC19 (10pg/μl 1 支)	4°C/-20°C/24 个月

#### ● 产品说明

大肠杆菌感受态制作试剂盒提供制作大肠杆菌感受态的两种试剂: W1 Solution、ST Solution, 及标准质粒 PUC19; 客户需要准备 LB 营养液和液氮。本试剂盒适用于 DH5a、TOP10、BL21 (DE3)、Rosetta (DE3) 等几乎所有大肠杆菌感受态的制作。W1 Solution 是一种制作大肠杆菌感受态的 buffer, 用来清洗大肠杆菌细胞, 去除其他离子, 提供稳定的 PH 值环境; ST Solution 是大肠杆菌感受态储存液, 用来重悬清洗后的大肠杆菌细胞。使用唯地生物的大肠杆菌制作试剂盒制作的大肠杆菌感受态细胞, 用 PUC19 质粒检测转化效率可达  $10^6$ - $10^9$  cfu/μg DNA。

#### ● 操作方法

##### 一, 感受态制作方法

1. 制作感受态前需要准备 LB 液体培养基, LB 平板, 液氮, -80 度超低温冰箱; 提前将 W1、ST Buffer 插入冰中预冷。
2. 大肠杆菌菌种在 LB 平板上划线, 挑新鲜的单菌落到 3-6ml LB (用 50ml 离心管) 中 37 度, 200rpm 摇菌 12-24h, OD600>2.0 即可。
3. 将三角瓶中 LB 液体培养基放 19 度摇床, 调 19 度预冷 30min, 按 2% 的比例接菌到 LB 中, 19 度, 200rpm 摇菌到 OD600=0.5-0.8; 按照 5ml 菌液制作一支感受态准备 LB 液体培养基。
4. 离心机提前调到 4 度预冷, 1700-1800g、5min 离心收集菌体, 吸干残液, 加入摇菌用 LB 1/25 体积的 W1 Solution, 用 5ml 枪头吹打大肠杆菌沉淀, 直到大肠杆菌细胞完全分散开, 溶液中无菌块, 冰水中静置 8min。
5. 4 度、1700-1800g、5min 离心收集菌体, 吸干残液, 插入冰中, 加入适量体积冰中预冷的 ST Solution (按摇菌用 LB 1/50 体积准备 ST Solution), 用 5ml 枪头吹打大肠杆菌沉淀, 直到大肠杆菌细胞完全分散开, 溶液中无菌块, 冰水中静置 8min。按 100ul/支分装感受态, 分装好的感受态立即放入液氮中, 液氮中 1-10min 后转入 -80 度超低温冰箱, 可长期保存 (如无温度波动, 可保存 2-5 年)。

### 二、感受态转化方法

1. 大肠杆菌感受态细胞从-80°C拿出，迅速插入冰中，5分钟后待菌块融化，加入目的DNA（质粒或连接产物）并用手拨打EP管底轻轻混匀(避免用枪吸打)，冰中静置25分钟。
2. 42°C水浴热激45秒，迅速放回冰上并静置2分钟，晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入700 μl不含抗生素的无菌培养基（SOC或LB），混匀后37°C，200 rpm复苏60分钟。
4. 5000 rpm离心1分钟收集菌体，留取100 μl左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的2YT或LB培养基上。
5. 将平板倒置放于37°C培养箱过夜培养。

### ● 包装说明

货号	包装含量
CAT#: ECK1010S	可制作感受态250支
CAT#: ECK1010M	可制作感受态500支
CAT#: ECK1010L	可制作感受态2500支

### ● 注意事项

1. 制作不同数量的感受态，按比例使用各种试剂，puc19质粒浓度过低，室温时容易降解，使用时插入冰中，放于手中缓慢解冻，1/3体积融化即可使用，不可长时间放室温解冻。
2. 此种方法制作的感受态可在-80度长期保存。
3. 不开封的试剂盒各组分可保存两年，开封后若发现染菌，停止使用。