

常态转化液说明书

产品编号: BTN51101

规格: 20T

产品及特点:

常态转化液能使各种常态的 *E. coli* 细胞直接用于快速转化实验, 使广大用户不再因为简单的转化实验而再为感受态细胞的制备, 保存和运输等繁琐的事情而操心, 大大地缩短了基因克隆实验的时间, 提高使用者的工作效率。

1. 不需专门制备感受态细胞, 直接使用常态的细胞进行质粒转化, 随用随配, 十分方便。
2. 常态细胞包括新鲜培养的菌液, 新鲜的或 4℃ 放置数月的培养基菌落, 甘油菌种保存液等。
3. 适用菌种和质粒广泛, 用过的 *E. coli* 菌种包括 K12 系的 DH5a 和 Tg1, B 系的 BL21 (DE3)。用过的质粒有 pGEM, pET 和克必隆系列等。
4. 转化效率适中, 使用 10ng 质粒转化一般能得到上万个转化子 (效率在 10^5 到 10^6 CFU/ug 质粒之间), 使用 3–5 μ L 连接液转化一般能得几千个转化子, 足够筛选重组子使用 (但不适合构建文库)。
5. 单管快速操作, 整个操作可以在一个 1.5 mL 塑料离心管中进行, 最短可以在三十分钟内完成, 不需要过夜细菌培养, 热休克处理甚至恒温摇床, 极其适用于自动化的大规模克隆筛选工作。
6. 稳定性好, 本可以在 -20℃ 条件下长期保存而不用担心转化效率的降低, 而感受态细胞在同样条件下会迅速失去活性。

格及成分:

成分	规格
常态转化液	1ml
阳性对照 (pGEM3 或 pUC19) 10 μ L, 1ng/ μ L	5T
说明书	1 份

保存条件:

低温运输, -20℃ 保存, 有效期一年。

自备试剂:

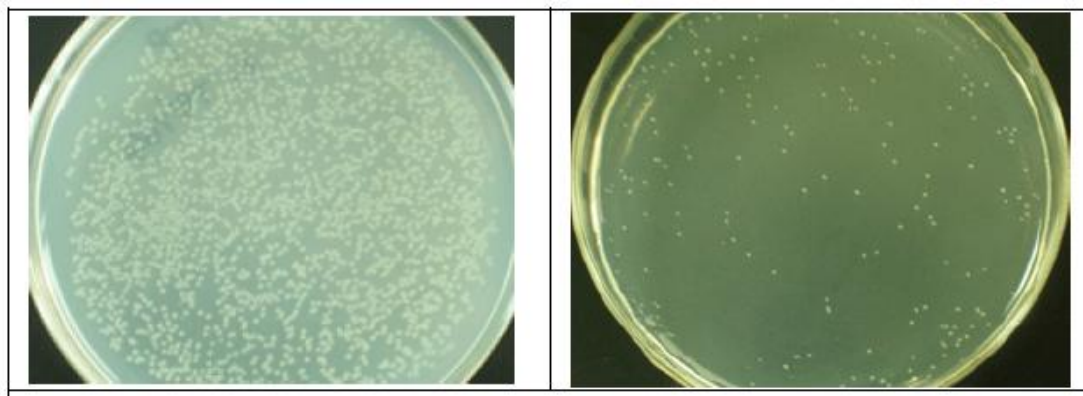
液体培养基本 (LB 或 SOC), 抗菌素。

使用方法:

1. 标记无菌的 1.5 mL 塑料离心管并加入 1 mL 液体培养基 (如 SOC 或 LB), 每次转化试验最好加上阳性对照 (用提供的 pGEM3 或其他质粒) 和阴性对照 (不加 DNA) 各一个。
2. 如果使用 *E. coli* 菌落, 则直接用接种环, 无菌牙签或无菌吸头从培养皿上挑取 1–5 个菌落 (直径在 3–5 mm 之间) 到每个离心管中, 用移液枪轻柔吹打散开。如果使用甘油菌种保存液, 则直接取 50–100 μ L 菌种液到 1 mL 培养液中。如果使用单个菌落培养得到的新鲜培养液, 则取 1 mL 培养了 3–4 小时的菌液直接从第 4 步开始。

3. 37℃保温 1 小时(如果保温时间延长到 3-4 小时, 可以提高转化效率一倍, 但过长则转化效率又开始降低)。
4. 室温 10000 rpm 离心 1 分钟后小心移弃上清(液体培养基), 离心速度低于 10000rpm 则细菌沉淀易丢失。沉淀的细菌约芝麻或麦片大小为宜。细胞过多或过少都不好。
5. 短暂离心, 用移液枪小心将残留的培养液(约 50 μL)吸出, 否则残留培养基将会严重影响转化效率, 故此步不能省略。
6. 加入 50 μL 冰浴的克必隆转化液并小心将细胞吹打均匀。
7. 加 DNA 样品。在样品管中加入 1-5 μL 连接反应液并轻柔吹打均匀; 在阳性对照管中加入 5 ng 阳性质粒(没被酶切的载体, 也可以使用常用的 pGEM, pUC, pBR322 等质粒); 在阴性对照管中加入连接反应的阴性对照, 如果没有则不加入任何溶液或加入 1-5 μL 无菌水。
8. 将上述离心管置于-20℃直到液体凝固为止(一般需要 20 分钟到 1 小时), 然后冰浴放置 5-10 分钟。
9. 在每个离心管中加入 1 mL 无抗菌素的 SOC 或 LB 培养液, 混匀后置 37℃水浴保温 1 小时以便让抗性基因表达, 否则将没有转化子生长。
10. 将溶液充分吹打混匀后分别取 30-200 μL 分别涂于含相关的抗菌素的培养盘上, 剩余溶液最好留 4℃待用。
11. 37℃ 16-24 小时培养, 阴性对照盘上不应有任何落菌, 否则可以判断操作中有污染或培养基中抗菌素浓度不够。使用质粒转化的阳性对照 100 μL 涂盘一般能有上千个菌落。连接样品转化所得菌落数将取决于连接反应效率等多种因素, 100 μL 的涂盘一般有几十到几百个转化子。

使用效果:



左图是用 10 ng 克必隆 G 载体转化 10 个 *E. coli* Tg1 菌落后得到的转化子。右图是用 3 μL 连接液(克必隆 B 载体+1 Kb DNA 片段, 10 μL 反应体系)转化 10 个 *E. coli* DE3 菌落后 37℃过夜保温得到的转化子。涂盘量均为 200 μL 。