

大肠克隆感受态制备及转化试剂盒

产品组分：

Component	PT1182	Store
大肠超级培养基	16g	RT
大肠 S1	100 ml	4°C
大肠 S2	20 ml	4°C
说明书	1 份	RT

大肠超级感受态的制备：

1. 活化菌种。-80°C 保存的菌种在 LB 固体培养基上划线，37°C 过夜；
2. 挑取酵母单菌落接种到 3ml 大肠超级培养基中，37°C，220 过夜培养；
3. 第二天转接到含有 250ml 大肠超级培养基的三角瓶中，37°C，220rpm，直至 OD600=0.5，收集细胞，2500g，离心 15min，去上清；
4. 沉淀用 50ml 的冰预冷的大肠 S1 轻柔吹悬。2500g，离心 10min，去上清；
5. 沉淀用 10ml 的冰预冷的大肠 S2 轻柔吹悬；
6. 把大肠超级感受态细胞悬浮液分装到 1.5ml 离心管中，每管分装 100 μ l，用于转化一个质粒即一个反应。或保存于-80°C，避免反复冻融。

转化方法:

1. 感受态细胞从-80℃拿出，迅速插入冰中，5min 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 30min;
2. 42℃水浴热激 45-90s，迅速放回冰中并静置 5min，晃动会降低转化效率;
3. 向离心管中加入 800 μ l 不含抗生素的无菌培养基 (2YT 或 LB)，混匀后 37℃，200 rpm 复苏 60min;
4. 6000 rpm 离心 5min 收菌，留取 100 μ l 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℃培养箱过夜培养。

注意事项

1. 大肠超级培养基称量后加去离子水，于 121℃高温高压灭菌 15min，冷却后使用。
2. 感受态细胞最好在冰中缓慢融化，插入冰中 8min 内加入目标 DNA，不可在冰中放置时间过长，长时间存放会降低转化效率。
3. 混入质粒或连接产物时应轻柔操作。
4. 转化高浓度的质粒或高效率的连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。