**Competent cell preparation Kit 说明书**

**制品说明**

大肠杆菌经过处理后可以摄取外源DNA（Plasmid DNA、Phage DNA等），处于这种状态的细胞称为感受态细胞（Competent Cell）。在基因工程实验中，经常要使用各种感受态细胞进行DNA的转化操作。实验使用的感受态细胞的来源大体可以分为两种：一种是购买商品化的感受态细胞，但商品化感受态细胞成本高、运输及保存有一定困难（超低温）；另一种是自己制备感受态细胞，实验人员自己制作感受态细胞时，往往受到各种试剂及实验条件等限制，制备的感受态细胞效率低，达不到实验要求。

Competent Cell Preparation Kit是一种方便、高效、快速制备感受态细胞的试剂盒。使用本试剂盒制备的感受态细胞可以满足大多数实验的需要，并且适用于几乎所有常用的大肠杆菌，例如：E.coli DH5α、JM109、Stbl3、HB101、BL21、Top10等，转化效率均可以达到1×107 cfu/μg pUC19以上（转化效率根据大肠杆菌菌株及转化用DNA不同稍有差异）。使用本试剂盒制备的感受态细胞可以在 -80℃保存一年。

**产品内容**

|  |
| --- |
| Solution I 100 mL |
| Solution II 20 mL |

● **保 存：** 4℃

**● 使用注意：**

1. 制作感受态细胞时的玻璃器皿或塑料容器应尽量洗净。因为微量的洗涤剂或污染物都可能降低感受态细胞的转化效率，因此在洗刷完用于制作感受态细胞的专用玻璃器皿或塑料容器后，最好用去离子水浸泡一晚，然后再充分洗净。

2. 制作感受态细胞时使用的菌种，不应使用4℃或常温保存的传代细菌。应使用-70℃保存的菌种，在LB或抗生素平板培养基上分级划线培养后，挑取单菌落。使用这种菌种制作的感受态细胞，转化效率较高。

3. 培养感受态细胞制备用菌体时，OD600值的测定应随时进行，以使 OD600值控制在 0.5～0.6之间。如果OD600值超出此范围，可能降低感受态细胞的转化效率。

4. 测定完OD600的菌体应立即冰上放置，终止菌体生长。

5. 感受态细胞的制备操作过程中，离心后弃上清时要尽量弃尽，否则会降低感受态细胞的转化效率。

6. 使用 Solution I、Solution II 悬浮沉淀时要轻轻吹动菌体并混匀，禁止剧烈振荡操作。

7. 为了有效确认感受态细胞的转化效率，最好制作一批高纯度的质粒DNA分装低温（-20℃）保存，用作阳性对照，以确认每批制作的感受态细胞的转化效率。

**感受态细胞的制备方法**

**1． 菌种纯化**

① 使用 LB或抗生素平板培养基（根据菌种性质加入适当的抗生素），用接种针挑取大肠杆菌（-70℃甘油保存菌），在平板培养基上分级划线，以能够出现单菌落为宜。

② 将上述划线的平板培养基倒置于恒温培养箱中37℃过夜培养。

**2． 菌体培养**

① 在超净工作台中，取5~10 ml无菌SOC移至10ml无菌试管中。

② 在划线平板培养基上挑取单菌落，接种到①的培养基中。

③ 37℃振荡（约220 rpm）过夜培养。

④ 取过夜培养的菌液2ml于200ml SOC中扩大培养。

⑤ 测定OD600值，当OD600值达到0.5～0.6 时（约培养3-4小时）放置冰中停止培养（如果OD600值超出此范围将不能保证感受态细胞的转化效率，冰上放置时间不宜超过半小时）。

⑥ 进行下一步操作。

**3． 感受态细胞的制备**

① 取上述菌体培养液50 ml于50 ml 离心管中。

② 1,500×g（一般的微型离心机约 4,000 rpm）4℃离心5分钟，弃上清（上清尽量除净）。

③ 在每个离心管中加入10 ml 冰中预冷的 Solution I， 轻轻吹动离心管，使沉淀悬浮均一，禁止剧烈振荡，然后4℃静置10min。

④ 1,500×g（一般的微型离心机约4,000 rpm）4℃离心5分钟，弃上清（上清尽量除净）。

⑤ 在每个离心管中加入2ml冰中预冷的Solution II，轻轻吹动离心管，使沉淀悬浮均一，禁止剧烈振荡，然后4℃静置10min。

⑥ 将感受态细胞分装至1.5ml microtube中，100ul每管，-80℃保存。本感受态细胞可以直接用于 DNA 的转化实验，也可以于-80℃中保存，以备以后使用，在-80℃保存时，可以有效保存一年以上，但不能反复冻融，一旦融解后，不能再进行-80℃保存。

**4 感受态细胞的 DNA 转化**

① 将-80℃保存的感受态细胞置于冰中融化10分钟。

② 向感受态细胞中加入0.1 ng～10 ng DNA或2 μl～5 μl的连接产物，轻轻混匀后冰中放 置30分钟。

③ 42℃水浴中放置45秒钟后，立即于冰中放置 1～2 分钟。

④ 加入950 µl 37℃预温的SOC培养基，37℃振荡培养1小时。

⑤ 取适量菌液涂平板后，将平板倒置于37℃培养箱中培养12-16h。

**5. 感受态效价测定**

使用本试剂盒按标准操作方法制备了DH10B 感受态细胞，使用pUC19 质粒0.1 ng转化至DH10B感受态细胞中，在含有 Amp抗性的L-琼脂平板培养基上形成单菌落，计算菌落数及转化效率，结果见下表。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 表. | DH10B感受态细胞的转化效率 | | |
| Sample | 感受态细胞量（ul） | 涂板量（μl） | | 菌落数 | 转化效率（cfu/μg pUC19） |
| A | 50 | 50 | | 175 | 3.5×107 |
| 50 | 100 | | 327 | 3.27×107 |
| B | 100 | 50 | | 186 | 3.72×107 |
| 100 | 100 | | 363 | 3.63×107 |
| 平均转化效率 | | | | | 3.53×107 |

**6. 相关试剂及培养基的制备方法**

**SOB 培养基**

1. 组份浓度：

|  |
| --- |
| 2%（W/V） Tryptone |
| 0.5%（W/V） Yeast Extract |
| 0.05%（W/V） NaCl |
| 2.5 mM KCl |
| 10 mM MgCl2 |

2. 配 制 量： 1 L

3. 配制方法：

① 配制250 mM KCl溶液。

在90ml的去离子水中溶解1.86 g KCl 后，定容至100 ml。用0.22μm滤膜过滤除菌。

② 配制2 M MgCl2溶液。

在90 ml去离子水中溶解 19 g MgCl2后，定容至100 ml，用0.22μm滤膜过滤除菌。

③ 称取下列试剂，置于 1 L 烧杯中。

Tryptone 20 g

Yeast Extract 5 g

NaCl 0.5 g

④ 加入约 800 ml 的去离子水，充分搅拌溶解后定容至1 L。

⑤ 高温高压灭菌后向培养基中加入10 ml 250 mM KCl溶液，5 ml 2M MgCl2 溶液，充分混匀。

⑥ 滴加5 N NaOH，调pH值至7.0，4℃保存。

**SOC培养基**

1. 组份浓度：

|  |
| --- |
| 2% （W/V） Tryptone |
| 0.5%（W/V） Yeast Extract |
| 0.05%（W/V） NaCl |
| 2.5 mM KCl |
| 10 mM MgCl2 |
| 20 mM Glucose |

2. 配 制 量: 1 L

3. 配制方法：

① 配制1 M葡萄糖溶液。

称量18 g的葡萄糖溶于90 ml去离子水中, 充分溶解后定容100 ml，用0.22μm滤膜过滤除菌。

② 向1 L SOB培养基中加入除菌的1 M葡萄糖溶液20 ml，充分混匀。