本周工作任务

1、入职

2、熟悉同事和工作环境

3、掌握感受态细胞制备的整个流程

4、每天配胶（上午下午各一轮：每轮2板1%，1板2%）

5、质粒抽提

2017/3/27

今日工作任务：

1、办理入职

2、熟悉同事和工作环境

3、跟着组长黎威熟悉工作内容

4、菌种纯化

① 使用 LB 无抗平板培养基，用10ul 的枪头挑取大肠杆菌DH5a（-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。

备注：

工作记录以周为单位

2017/3/28

今日工作：

1、配胶

2、 配置TFB1 溶液

1）kcl法的配方：

|  |  |
| --- | --- |
| TFB1 250ml | TFB2 100ml |

|  |  |
| --- | --- |
| MnCL2.4H2O：  2.47g | KMOPS： 0.42g |
| KCL :                  1.87g | KCL ： 0.074g |
| CaCL2.2H2O：   0.37g | CaCL2.2H2O ： 1.1g |
| KAc ：                0.74g |  |
| Glycerol :            37.5ml | Glycerol ： 15ml |
| 用HAc（约36μL）调PH值至5.8。 | 用KOH（约107μL）调PH值至6.5。 |

2) 注意事项：

* + PH计的使用：分别用 ph7.0、ph4.01 的标定液标定，标定容错值为0.02。
  + 使用容量瓶定容。
  + 过滤器过滤TFB1，保存到4°C

3、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1 min后，立即于冰中放置2 min。

④ 超净台中加入600µl 37℃预温的SOC培养基，37℃ 660 rpm振荡培养45 min。

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。

4、菌体培养

① 在超净工作台中，取5~10 ml无菌SOC移至10ml无菌培养管中。

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。

备注：

**配胶**

1、体积比

2、Abigreen 10%

明日计划：

1、早上来先配胶 1% 2板，2% 1板；

2017/3/29 12:49

今日工作：

1、配胶

     4板（1%）

2、质粒小提（手提）【6个】

1）用 250ul  溶液P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。

2）加 250ul 溶液P2 温和地上下翻转6~8次，使菌体充分裂解，室温放置4分钟。

3）加 350ul 溶液P3 ，立即温和地上下翻转 6~8次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀；然后，13,000rpm 离心10分钟。

4）将上清加入到吸附柱AC中（吸附柱放入收集管中），12000rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液。

5）加入 600ul 漂洗液WB，12000rpm 离心 1min，弃掉废液。（注意：漂洗液WB 用之前要检查是否已经加入无水乙醇）

6）重复步骤 5） 一次。

7）将吸附柱AC 放回到收集管中， 13000rpm 离心 2min。（尽量除去 漂洗液，防止漂洗液中的残留乙醇抑制下游反应）

8）取出吸附柱AC，放入到对应的用于存放质粒的离心管中，在吸附柱的中间部位加入50ul 的洗脱缓冲液EB，室温放置2min，12000rpm 离心 1min，即可收集到质粒。

3、富集菌体【10个】+质粒小提（机提）【10个】

3.1 富集菌体

1）按照菌液名称对应标记 2ml的菌体收集管。

2）取2ml菌液放入2ml的菌体收集管中，12,000rpm离心 1min，然后尽可能倒干上清；重复1~2次；收集到菌体。

3.2 质粒小提（机提）

1）将2ml 的菌体收集管放入到对应的槽中。

2）将 吸附柱AC 和 质粒收集管放置到adpter 的对应位置。

3）加入100ul 的平衡液到吸附柱AC上

4）检查 溶液P1、p2、p3 和 漂洗液WB、洗脱缓冲液EB 是否足量。

5）放入对应数量的灰色枪头（N+5） 和黑色枪头（N）。

6）运行测序程序即可。

4、**感受态细胞的制备**

1）测定OD600值，当OD600值达到0.4~0.6 时（0.5左右），放置冰中停止培养30min（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）。

2）预冷离心机到4°C。

3）取菌体培养液50 ml于50 ml 离心管中（此步骤也在冰上操作）。

4）4,200 rpm | 4℃离心5分钟，弃上清（上清尽量除净）。

5）重复3）、4）步骤一次。 期间将要用的 1000ul和200ul 的枪头、TFB1 放到 -80°C 中预冷。

6）在每个离心管中加入10 ml （按50ml培养液的量，如果集菌2次，就要加入20ml）冰中预冷的 Solution I（TFB1）， 用1000ul的枪头轻轻吹动离心管，使沉淀悬浮均一，禁止剧烈振荡，然后4℃静置10min。

7） 4,200 rpm | 4℃离心5分钟，弃上清（上清尽量除净）。

8）在每个离心管中加入2ml冰中预冷的 Solution II(TFB2)，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。

9）将感受态细胞分装至1.5ml microtube中，70ul每管，-80℃保存(液氮/冰箱)。     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。

10）菌检：从批次中取一管，在 氨苄（Carb/amp）、kana、氯霉素（CHL）平板上划线，37°C过夜，如果第二天没有长菌，则此批次的感受态细胞合格。

备注：

1）一般的微型离心机4,200 rpm 约为 1500g。

          2）测定OD600 的操作:

               1 进入 home>cell cultures>勾选 use cuvette> 比色皿 中加入待测样品的空白对照，black 。

               2 使用比色皿，加入2/3体积的待测液，测定OD600.

明日计划：

1、配胶

2、质粒提取

**2017/3/30 10:30**

今日工作：

观察昨天的 氨苄（Carb/amp）、kana、氯霉素（CHL）平板 感受态细胞制备的菌检：没有杂菌，感受态可以使用。

1、（电转法）感受态细胞的制备

（水洗去除细胞表面的离子）

耗材及试剂：

     50ml离心管；离心机；冰盒；4°C无菌水； 10%甘油；

步骤：

1）菌液放置到冰中停止培养~~。

2）取菌体培养液50 ml于50 ml 离心管中（此步骤也在冰上操作）。

3）4,200 rpm | 4℃离心5分钟，弃上清（上清尽量除净）。

4) 有150ml菌液。重复2）、3）步骤 3 次。 期间将要用的 1000ul和200ul 的枪头

5）弃上清（上清尽量除净），如有残留的上清可用 1000ul的枪头吸出。

6）向 50ml 离心管中倒入少许 4°C 预冷的无菌水，用1000ul 的枪头吹悬菌块沉淀，悬浮均匀后再增加水量到 50ml。

7) 步骤6）完成后，冰浴 15min（注意：在剩余 5min 时，将水放置到 -80°C 保存）；然后，4200rpm | 4°C 离心 5min。

8）离心后，倒掉上清液，重复 6）、7）步。

9）加入少许4°C 预冷的 10%甘油,用1000ul 的枪头吹悬菌块沉淀，悬浮均匀后再增量到 50ml。完成后，冰浴 15min。然后，5000rpm | 4°C 离心 10min。

3、感受态细胞的 DNA 转化（电转法）

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（不要超过感受态细胞体积的 10%），轻轻混匀后冰中放置30分钟。

4、质粒小提（机提）（3管）

  1）测定浓度。

注意：

* 质粒提取仪的工作液不能超过警戒线。
* 工作液用时开盖，提完质粒盖盖，并将p1 放回到 4°C保存。

5、"梯度稀释"提取的质粒到 0.1ng/ul

6、感受态DNA 转化及效价测定（化学法）

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DNA或连接产物(0.1ng/ul的质粒 1ul + 感受态细胞100ul)，轻轻混匀后冰浴放置30分钟。

③ 42℃水浴中热激1钟后，立即冰浴放置 2 分钟。

④ 加入900 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（吸取100ul，再加入900ul SOC培养基，吸取100ul涂板； 原样100ul涂板。），将平板倒置于37℃培养箱中培养12-16h。

备注：

1）DNA转化有 2 种方法：

Cacl法 、

电转法：

2) 电转法的电击步骤：

打开`电转仪`，（旋钮用于调节电压）调节电压到 1800V，按下`start`即可（仪器自动控制时间，约为5ms）。

在基因克隆技术中，所谓转化是指质粒或重组质粒被导入受体细胞，表达相应的选择标记基因，并在一定的培养条件下，在选择性培养基上长出转化子的过程。

明日计划：

1）查看今天“（化学法）感受态细胞DNA转化”涂的2 个平板（一个正常浓度，一个是100：900ul）。

**2017/3/31**

**今日工作：**

1、质粒小提（机提：12个）。

2、昨天的“（化学法）感受态细胞DNA转化”的效价测定（用的是PUC19）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 稀释倍数 | 未稀释 | 10倍稀释 |
| 菌落数（个） | 2 个 | 14 个 |

3、点样：

     样品+lodding\_buffer（6X） , plus ladder或者marker；

4、切胶回收：

1）点样跑胶；

2）拍照判断是否切胶，紫外仪上切胶放到离心管中，倒入3倍体积的`溶液液DD`溶胶液，57°C溶胶；

3）将回收吸附柱放到 2ml离心管中，将溶胶液倒入`回收吸附柱中`，12000rpm 1min。

4）用 200ul  WB 洗 2 次；

5）空甩 2 min；

6）用20ul EB 溶解。

7）测定浓度。

**明日计划：**

**2017/4/1**

今日工作：

0、配胶。

1、效价：指的是1ug的标准质粒能够转化出的菌落数。

2、质粒小提机提。

3、菌液PCR

3.1、用菌液作为template；

3.2、引物对：A:(JY14001/HS-BVC-LW262), B: ( HS-BVC-LW222/HS-BVC-LW248 )。

3.3、预混合 10ul 体系：

| 2X Taq mix     5ul |

| primer 1          1ul |

| primer 2          1ul |

| dH2O               2ul |

| template          1ul |

3.4、设置 菌液 PCR 程序：

——————————————

| 预变性     94°C     2min |          |

| 变性          94°C     30s |          |

| 延伸          60°C     30s | 25cycles|

| 退火          68°C     45s |          |

|                  68°C     5min |          |

| 4°C forever

3.5、跑胶

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

4、电转化

1. 从-80℃冰箱中取出1.5ml 的离心管中 `用于电转法的感受态细胞`（实际体积为70ul ），置于冰上解冻`10min`；
2. 取1 μl纯化后的`质粒`于解冻的感受态细胞中，小心混匀，冰上放置10min。 将其和0.1CM的`电极杯`一起置于冰上预冷。
3. 打开电转仪，调至Manual，调节电压为1800V。准备 SOC 培养基、枪头1000ul、200ul
4. 将此混合物转移至已预冷的电极杯中，轻轻敲击电极杯使混合物均匀进入电极杯的底部；
5. 将电极杯轻轻推入电转化仪，按一下start键，听到蜂鸣声后，向电击杯中迅速加入1000μl的SOC液体培养基，重悬细胞后，转移回1.5ml的离心管中。
6. 恒温震荡仪上，30℃，660rpm复苏45min。
7. 取 100μl 涂CHL板，放于常温，过夜培养，次日查看转化结果。

5、清洗电击杯：

1. 放入乙醇中侵泡。
2. 用毛刷清洗内壁。
3. 清水冲洗。
4. 烘干箱烘干。
5. 紫外照射，完后就可以保存以便下次使用。

明日任务：