# 方案：pDNA文库的扩增

材料

100μL电感受态细胞（STBL4TM，Thermo Fisher Scientific，11635-018）

400ng文库质粒DNA

4个电穿孔比色皿（间隙0.1厘米，Bio-Rad，165-2089）

10毫升SOC（1X SOC，New England BioLabs，B9020S）

4个生物测定板（500cm2，LB琼脂+抗生素）

2个Maxi-preps（Qiagen HiSpeed Maxi，12663）

生物展布器（Bacti细胞展布器，VWR International，60828-684）

电穿孔仪（MicroPulserTM，Bio-Rad，1652100）

协议

第1天（下午）

1.将400ng pDNA添加到100μL电感受态细胞中。

2.将25μL细胞加入比色皿中，使用Ec1设置（1.8 kV）进行电穿孔，立即加入1mL预热的SOC并转移至圆底14 mL管中。

3.再重复3次，直至加完10mL SOC。

4.将5 mL溶液分装到两个14 mL试管中；在30°C下振摇1小时。

5.预热生物测定。

6.在4个生物测定中分别接种2.5 mL细胞。使用生物铺展剂或玻璃珠均匀分布。

7.在30°C下孵育16–18小时（见注释）。

第二天（上午）

1.生长16-18小时后，使用生物扩散器将装有冷LB（通常每板20mL）的平板刮入50 mL锥形管中，每管两板，总共两管。执行此操作时将管子放在冰上。

2.离心离心管，倒出培养基，称量沉淀物。总重量约为1-2克。每个锥形管为单个Maxiprep。

3.根据制造商的说明通过Maxiprep进行纯化，但有两点修改：a）将P1、P2、P3直接添加到锥形瓶中，然后离心以使裂解碎片沉淀，再添加到柱塞中；b）在洗脱之前，将洗脱缓冲液加热至50°C。

4.通过Illumina对序列库进行确认，以确认代表性的维持。详情请参阅Illumina PCR协议。

注意：对于sgRNA文库，使用STBL4细胞时，在37°C下生长14–16小时（而不是30°C）是可以接受的。不过，许多其他感受态细胞在37°C下会显示出明显更高的重组率。