**扩增Brunello pDNA文库**

（1）预先准备4个含100ug/ml氨卞西林抗生素的500 cm² LB固体平板培养基，倒置于30℃预热备用；同时将SOC培养基预热至30℃；

（2）取100 μL Stbl4感受态细胞，置于冰上融化，并将电转仪调整至以下设置；

|  |  |
| --- | --- |
| 电击杯规格 | 1.0 mm cuvette |
| 电容 | 10 μF |
| 电阻 | 600 Ohms |
| 电压 | 1800 Volts |

（3）取400 ng质粒文库，加入至100 μL感受态细胞中，轻柔混匀，冰上孵育；

（4）每次转移25 μL感受态混合物至1.0 mm间隙的电转杯中，使用电转仪进行电转化操作，电击时间应在1－5 ms间，随后立即加入1 mL预热的SOC培养基，转移至14 mL圆底试管中；

（5）重复电转操作3次，将总液体体积补充至10 mL SOC培养基，并分装至两个14 mL圆底试管中，每管5 mL，30℃ 220 rpm振荡培养1小时；

（6）将细胞混合物分别均匀涂布至4个500 cm²预热LB平板上，使用玻璃珠或涂布器均匀分布，确保细胞均匀铺展；

（7）30℃条件下培养16-18小时（也可37℃培养14-16小时）。

**7.2.4 提取和验证**

（1）使用冰冷的LB培养基刮取平板上的菌落，每个平板加约20 mL，收集菌液至50 mL离心管中，保持离心管置于冰上；（重复刮取两次）

（2）4000 rpm离心菌液，弃去上清后称量细胞沉淀，单管沉淀质量应为1-2 g（对应一次质粒提取）；

（3）根据提取试剂盒（Qiagen HiSpeed Maxi Kit）操作手册进行质粒提取，操作时需注意以下两点：

将裂解液P1、P2、P3直接加入离心管中，离心去除裂解碎屑后再加入柱中；

使用50℃预热的洗脱缓冲液进行洗脱，确保提取效率；

（4）提取后的质粒文库进行Illumina测序，以确认文库代表性未发生明显变化。