天净沙系列

CAT#:230811

常温运输和保存

天净沙

乳酸乳球菌电转感受态细胞制备试剂盒

Lacotococcus lactis Electrocompetent Cell Preparation Kit

使用手册 V1.02

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是用于制备乳酸乳球菌电转感受态细胞的试剂盒。它具有下列特点：

1. 操作简单，即开即用，用户不需要花时间优化条件。
2. 制备得到的电转感受态细胞可以-80℃保存一年，方便多次使用，免去每次转化都要新鲜制备感受态细胞。
3. 主要用于乳酸乳球菌，但能否用于其他乳球菌不详。
4. 最高转化效率可达到 2E7 个转化子/μg 质粒 DNA，但实际效率跟质粒长度、质粒浓度、恢复培养基等多种因素相关。
5. 得到的电转感受态细胞可以用各种穿梭质粒 DNA 进行电转化。
6. 本试剂盒足够制备 20 次，共 200 管乳酸乳球菌电转感受态细胞（每管 70 μL）。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用大扁盒包装

成份	编号	规格	包装
乳酸乳球菌电转感受态细胞制备溶液 A	230811a	50 mL×3	60 mL 本色瓶
乳酸乳球菌电转感受态细胞制备溶液 B	230811b	50 mL	60 mL 本色瓶
乳酸乳球菌电转感受态细胞制备溶液 C	230811c	30 mL	30 mL 本色瓶
使用手册	230811sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，有效期一年。

自备物品

GM17 液体培养基、含 0.5 M 蔗糖和 2.5%甘氨酸的 GM17 液体培养基、恢复培养基（含 2 mM $CaCl_2$ 和 20 mM $MgCl_2$ 的 GM17 液体培养基)、600 nm 分光光度计、电转仪。

使用方法

一：电感受态细胞的制备

1. 挑取平板划线后培养得到的新鲜单菌落，接种到 5 mL 自备的 GM17 液体培养基中。30℃静置厌氧培养 12-16 小时。
2. 转移 2.5 mL 上步所得培养菌液到 50 mL 自备的 GM17 液体培养基中。30℃静置厌氧培养 12-16 小时。
3. 转移 4 mL 上步所得培养菌液到自备的 250 mL 含 0.5 M 蔗糖和 2.5%甘氨酸的 GM17 液体培养基中，30℃静置厌氧培养直到 OD600 达到 0.5-0.8 之间。
4. 将培养物转移到无菌离心管中 4℃ 6000×g 10 分钟，弃上清。离心时将溶液 A、溶液 B 和溶液 C 放冰上预冷待用。
5. 加入 7 mL 的溶液 A 重悬细菌。此时细菌的浓度约为 1E9 个/mL。
6. 重悬后室温放置 30 分钟，4℃ 6000×g 10 分钟，弃上清。室温放置 30 分钟很重

	要，不能跳过。 7. 加入 1.5 mL 预冷的溶液 B 重悬细菌，然后 4℃ 6000×g 10 分钟，弃上清。 8. 再加入 1.5 mL 预冷的溶液 C 重悬细菌，然后 4℃ 6000×g 10 分钟，弃上清。 9. 再加入 0.7 mL 预冷的溶液 B 重悬细菌，按每管 70 μL 分装到 1.5-2.0 mL 的离心管中，此时细菌的浓度约为 1E10/mL，共得 10 管电感受态细胞。 10. 将感受态细胞全部放入-80℃冰箱待用。注意：不能放在液氮中，否则将丧失电转化能力。 **二：电转化乳酸乳球菌感受态细胞（本试剂盒不含相关试剂）** 11. 将装有 70 μL 感受态细胞的冷冻管从冰箱取出的、放置在 30℃水浴中快速化冻(快速化冻的效果好于缓慢化冻)。 12. 加入 500 ng 左右质粒 DNA 并轻柔混匀。 13. 迅速转移到预冷的、距离为 0.2 cm 的电击杯中。 14. 按电击仪的手册设置电击参数并进行电击处理，参考条件为：12.5 kV/cm (对 0.2 cm 的电击杯，则为 2.5 kV，200 Ω，25 μF，相当于脉冲长度为 4 ms)。各厂家电转仪器的使用略有不同，请严格按电击仪厂家提供的手册进行操作。注意：如果爆杯，可能原因一是样品含有气泡，可在加样时注意避免或稍静置一会儿再电转；二是电转杯未清洗干净、有杂质或老化，可重新清洗或更换电转杯；三是样品含盐量较高，可在第 9 步重悬后，离心弃上清并再次用 B 溶液重悬再进行后续操作；四是电压过高，可将电压调整至 2.0 kV，再次尝试。 15. 电击后迅速将细胞和 1 mL 预冷的恢复培养基（配方见自备物品）轻柔混匀，再转移到 1.5 mL 的塑料离心管中，30℃静置厌氧培养 2 小时。 16. 取 0.2 mL 涂盘于含相应抗菌素（由质粒的抗性基因决定）的 GM17 平板上，30℃厌氧培养 1-2 天。 17. 观察并记录转化子，计算转化效率，并进行后续实验。
关联产品	GM17 液体培养基、乳球菌质粒 DNA 纯化试剂盒