

细胞生物学：电转化流程 PDF转换可能丢失图片或格式，建议阅读原文

https://www.100test.com/kao_ti2020/475/2021_2022__E7_BB_86_E8_83_9E_E7_94_9F_E7_c67_475737.htm

一、电转化感受态细胞的制备

- 1.用枪头挑取单克隆菌落，投入盛有10ml LB液体培养基的50ml离心管中。（同时做培养基和枪头的空白对照）
- 2.37℃，220rpm，培养14-16个小时。
- 3.第二天，以1：100的比例将这10ml菌液倒入1000ml LB液体培养基中，37度，220rpm，振摇2-3小时，每半小时测一次OD，当OD值达到0.3-0.4时，停止培养。
- 4.将菌液在冰上预冷30分钟，随后将菌液分装到500ml 预冷的离心杯中，4℃，2500rpm离心10分钟。
- 5.弃上清，离心杯中加入少量ddH₂O，使沉淀悬浮后，再将水注满离心杯，4℃，4000rpm离心10分钟。
- 6.弃上清，加少量灭菌水，重悬菌体，再将水注满离心杯，4000rpm，4℃，离心10min.
- 7.弃上清，往离心杯中加入少量10%甘油（灭菌，预冷），重悬菌体，再加满10%甘油，4℃，4000rpm，离心10min.
- 8.弃上清，每个离心杯中加入5ml10%的甘油，使沉淀悬浮后，将菌液以300ul/管分装于1.5ml的离心管中，-80℃冰箱中保存。同时取100 μl感受态加0.01ng puc18直接电穿孔转化，检测转化效率。
- 9.次日观察转化子生长情况，并记录。

二、连接产物纯化

- 1.将连接产物转移至—1.5ml Eppendorf管中，加入下列试剂：10ul of ddH₂O 2ul of 3M NaAC（PH5.2）50ul of 无水乙醇 轻轻混匀，稍微离心并将其置于-20℃放置1小时以上；
- 2.4℃，top Speed 离心30分钟；
- 3.小心移去上清，避免接触到管底的沉淀物；
- 4.加入500ul70%的乙醇，轻轻颠倒几次洗涤沉淀（注：不要离心混匀）；
- 5.4℃，top

Speed离心5分钟；6.小心移去上清，将此Eppendorf管置空气中直至无乙醇气味；7.加入10ulddH₂O重新溶解沉淀，4 短期保存，-20 长期保存备用；三、电转化 1.从-80 冰箱中取出感受态细胞，置于冰上解冻；2.取1 μl 纯化后的质粒于一1.5ml的离心管中，将其和0.1CM的电极杯一起置于冰上预冷。3.将40~100ul解冻的感受态细胞转移至此1.5ml 的离心管中，小心混匀，冰上放置10min. 4.打开电转仪，调至Manual，调节电压为2.1KV. 5.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；6. 将电极杯推入电转化仪，按一下pulse键，听到蜂鸣声后，向电击杯中迅速加入1000 μl的SOC液体培养基，重悬细胞后，转移到1.5ml的离心管中。7.37℃，220 - 250rpm复苏1小时。8. 取20ul转化产物加160ulSOC涂板，放于37℃ 温室，过夜培养，次日查看转化结果。其余菌液加1：1的30%的甘油后混匀 - 80℃ 保存。注：每块加有Amp的平板上均匀涂有X-Gal 80 μl，SOC 80 μl，IPTG 20 μl. 四、电击杯清洗流程 1.用清水将电击杯稍冲一下。2.向电击杯中加入的75%酒精浸泡2hr. 3. 弃去酒精，再用蒸馏水冲洗2~3遍，然后用1ml的枪吸取超纯水反复吹打电击杯10遍以上。4.加入无水乙醇2ml于电击杯中，浸泡30分钟。5.弃去无水乙醇，于通风厨内挥干乙醇。6. 将清洗好的电击杯放入-20℃ 冰箱内待用。注：1.不同样品使用的电机杯应分开；2.每周用1%酒精浸泡30分钟。 100Test 下载频道开通，各类考试题目直接下载。详细请访问 www.100test.com