

天
净
沙
系
列

CAT#:51101-50
低温运输、-20℃保存

TIANDZ

天净沙 E.coli 转化液

E.coli Tranzol

使用手册 V3.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路26号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>天净沙 E.coli 转化液是本公司独家推出的不需要 E.coli 感受态细胞的转化液，它可将质粒直接转化进入常态的 E.coli 细胞中，使用户不需为感受态细胞的购买、制备、保存和运输等繁琐的事情操心，大大地缩短了转化的时间，提高使用者的工作效率。本产品的特点如下：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 产品稳定，保质期至少三年。不需要干冰运输、不需要-80℃冰箱保存。 2. 一次转化可以多次涂盘（即涂盘 1/10 后，保存冰箱，如果需要可以再涂盘）。 3. 既可使用甘油菌，也可使用菌落进行转化。 4. 标准操作需 1 小时多，转化效率一般可达 10E7 cfu/ug，跟化学感受态细胞的转化效率相当。 5. 极速操作只需要 10 分钟，效率比标准操作低 100 倍，可用于质粒转化保种。 6. 可用各种常见的 E.coli 菌种。 7. 可转化各种类型(长度、抗性、拷贝数)的质粒，也可转化各种连接反应液，但不推荐用于文库构建。 8. 性价比高，由于不需要干冰运输和-80℃保存，所以邮寄和保存成本大大降低。本规格足够至少 50 次转化（含对照样转化），每次转化的综合成本不到 15 元。 																				
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="475 1126 1394 1509"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>天净沙 E.coli 转化液</td> <td>51101a</td> <td>1 mL×5（白色盖,1.5mL 管）</td> </tr> <tr> <td>E.coli DH5a 菌液</td> <td>51101b</td> <td>100 uL（红色盖,0.5mL 管）</td> </tr> <tr> <td>pUC19 (0.1ng/uL)</td> <td>51101c</td> <td>50 uL（蓝色盖,0.5mL 管）</td> </tr> <tr> <td>50×LB 添加剂（赠品）</td> <td>51101d</td> <td>1.5 mL（绿色盖,0.5mL 管）</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>51101sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成 份	编 号	十孔盒包装	天净沙 E.coli 转化液	51101a	1 mL×5（白色盖,1.5mL 管）	E.coli DH5a 菌液	51101b	100 uL（红色盖,0.5mL 管）	pUC19 (0.1ng/uL)	51101c	50 uL（蓝色盖,0.5mL 管）	50×LB 添加剂（赠品）	51101d	1.5 mL（绿色盖,0.5mL 管）	使用手册	51101sc	1 份
成 份	编 号	十孔盒包装																			
天净沙 E.coli 转化液	51101a	1 mL×5（白色盖,1.5mL 管）																			
E.coli DH5a 菌液	51101b	100 uL（红色盖,0.5mL 管）																			
pUC19 (0.1ng/uL)	51101c	50 uL（蓝色盖,0.5mL 管）																			
50×LB 添加剂（赠品）	51101d	1.5 mL（绿色盖,0.5mL 管）																			
使用手册	51101sc	1 份																			
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存。有效期三年。</p>																				
<p>自备试剂</p>	<p>灭菌的50%甘油(第一次使用时需要)、LB液体和固体培养基、相关抗菌素、E.coli 宿主菌、质粒DNA或连接液。</p>																				
<p>使用方法</p>	<p style="text-align: center;">直接用甘油菌转化（推荐方法）</p> <p>一、甘油菌的制备</p> <p>注意：不建议使用实验室的已有的、无生产记录的甘油菌。本试剂盒赠送E.coli DH5a菌液一管，用户如果需要其他宿主菌，则需从本公司另行购买。北京天恩泽基因有上百种E.coli菌种供选购。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 将本试剂盒的E.coli DH5a菌液或自备的其他宿主菌在LB固体培养基上划线。 																				

2. 37℃过夜培养得单菌落。
3. 下班前将单菌落接种在3mL自备的LB液体培养基中，37℃过夜培养。
4. 早上取接种过夜培养的细菌500uL到50mL LB液体培养基中（接种体积为终体积的1%），37℃准确培养六小时。
5. 六小时培养结束时加入等体积（50mL）的自备无菌50%甘油，充分摇匀得甘油菌。最好在加入50%甘油之前测量并记录OD600。
6. 在无菌条件下将甘油菌分装到无菌的1.5mL塑料离心管中，每管500uL，共约200管（足够约200次转化实验），放-20℃或-80℃保存待用，可保存3年左右。如果需要制备比200管更多或更少，则自行调整菌液和50%甘油的体积。甘油菌在保存过程中不能反复冻融。

二、甘油菌的转化的（标准操作）

7. 将天净沙E.coli转化液放常温融化，充分摇晃均匀，冰上预冷待用。
8. 从-80℃冰箱中直接取N+2管上步制备的甘油菌（每管500uL），冰上融化。N是样品数，另外两只分别用于阴性对照和阳性对照。
9. 13,000g常温离心1分钟后，小心移弃上清，不要移弃管底的细菌沉淀。
10. 加入500uL的自备LB液体培养基轻柔重悬细菌。可以再在无菌条件下加入10uL促转化剂（赠品），本产品可增加转化效率2倍左右。
11. 37℃水浴或金属浴30分钟。由于空气传热太慢，故不建议使用孵箱。孵育结束后的OD600在1.2左右最佳（如果是NanoDrop检测，应该在0.12左右）。
12. 常温13,000g离心1分钟后小心移弃液体培养基。
13. 再短暂常温离心，用移液枪小心将残留的液体培养基(约50 uL)吸出。
14. 加入100 uL 预冷的天净沙E.coli转化液，轻柔将细菌重悬。
15. 加入不超过总体积10%(即10uL)的质粒DNA溶液（10-100ng）或连接反应液。此转化液+细菌+质粒混合液下面简称转化混合液。
16. 在-20℃或-80℃冰箱放置直到冻凝成固体（一般需要5-20分钟，下同）。
17. 放常温融化后，再在-20℃或-80℃冰箱放置直到冻凝成固体。
18. 放常温融化后，将100uL的转化混合液全部或部分加入到500uL自备的LB液体培养基中。一般使用1/10，必要时可全部使用。剩下的转化混合液可以放-20℃或-80℃冰箱长期保存供下次恢复培养和涂盘。最后再加入10uL 50×LB添加剂（赠品），它可以使转化效率提高2倍。
19. 37℃水浴或金属浴保温60分钟以让抗性基因表达。

	<p>20. 菌液在常温13,000g离心1分钟，去除适量上清使其剩下的培养基体积在50-100uL之间，重悬细菌后涂盘在含适当抗菌素的LB固体培养基上。</p> <p>21. 将培养皿放37℃孵箱倒置培养16-24小时，对转化子进行筛选。</p> <p>三、甘油菌的转化（极速操作，只适用于质粒转化保种）</p> <p>22. 取出天净沙E.coli转化液放常温融化，充分摇晃均匀并放冰上待用。</p> <p>23. 从-80℃冰箱中直接取甘油菌（每管500uL），冰上融化后标注样品号，对照等。</p> <p>24. 融化后13,000g常温离心1分钟后，小心移弃上清。</p> <p>25. 再短暂常温离心，用移液枪小心将残留的液体培养基(约50 uL)吸出。</p> <p>26. 加入100uL 预冷的天净沙E.coli转化液，轻柔将细菌重悬。</p> <p>27. 在样品管中加入不超过10uL的待转化的质粒。</p> <p>28. 在-20℃或-80℃冰箱放置直到冻凝成固体（一般需要5-20分钟）。</p> <p>29. 常温融化后，转移10uL转化液混合液到在含相关抗菌素的培养皿上，再加入50uL自备的LB液体培养基，直接涂盘。不加50uL LB液体培养基很难涂盘。</p> <p>30. 37℃孵箱倒置培养16-24小时。</p> <p style="text-align: center;">直接用菌落转化</p> <p>四、菌落的制备</p> <p>31. 将本产品提供的E.coli DH5a菌液在LB固体培养基上划线，37℃过夜培养得单菌落，这些菌落在一月内可以直接用于菌落的标准转化和极速转化(见五和六)。本试剂盒含E.coli DH5a菌液一管，用户如果需要其他宿主菌，则需另行购买。</p> <p>五、菌落转化的标准操作</p> <p>32. 挑选20个单菌落(涂盘时间不超过1个月)到500uL LB液体培养基中轻柔混匀。</p> <p>33. 接甘油菌转化的标准操作流程的第11步进行后续操作。</p> <p>六、菌落转化的极速操作（比菌落标准操作效率低100倍，只适用于质粒转化保种）</p> <p>34. 挑选20个单菌落(涂盘时间不超过1个月)到100uL预冷的转化液中轻柔重悬。</p> <p>35. 接甘油菌转化的标准操作流程的第27步进行后续操作。</p>
<p>疑难解答</p>	<p>Q: 为何没有转化子或者转化效率很低?</p> <p>A: 最可能的原因是细菌活力不够。如何判定? 在甘油菌或菌落在加入 500uL LB 液体培养基重悬细胞后，测 OD600，然后放 37℃水浴或金属浴培养 30 分钟，再测 OD600。如果 OD 值没有增加 50%以上，则需要使用新的宿主菌。</p>
<p>关联产品</p>	<p>菌落筛选试剂盒（70803）。</p>