

菌液及质粒使用手册

Version 1.0

本手册包括菌液和质粒的使用储存、菌种活化、质粒扩增等常规操作

❖ 菌种的保存及使用

普舟基因提供一管含有目的基因的重组质粒的 15%甘油菌，体积 200ul~1000ul 备用。

- 1、甘油菌可室温保存，周期约为 1 周；也可 -20℃ 保存，周期约为 1 年；
- 2、甘油菌的使用：根据质粒的抗性进行扩大培养，吸取 100-200ul 甘油菌接种到含有相应抗生素液体培养基中扩大培养即可。如遇菌种活性低或者活化率成功率不高的情况，建议先对菌种进行活化。活化方法如下：

❖ 菌种的活化

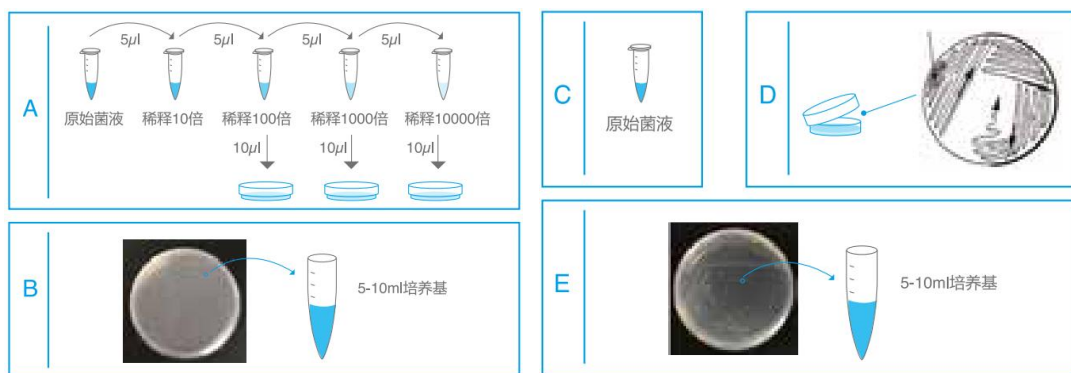
普舟基因推荐使用菌液稀释涂板法或者平板划线法。

➤ 菌液稀释涂板法

- 1、将菌液混匀后进行梯度稀释，分别稀释至 100、1000 和 10000 倍（图 A）；
- 2、取 10ul 分别均匀涂布到含有相应抗生素的固体培养平板表面，于 37℃ 培养箱中倒置培养 12-16h；
- 3、挑取平板上的单个菌落，接种于含有相应抗生素的液体培养基中（图 B），37℃，220rpm 震荡培养 12-16h；
- 4、取 650ul 新鲜菌液，加入 150ul 80%甘油，混匀，保存于 -80℃。

➤ 平板划线法

- 1、将接种环在酒精灯上灼烧灭菌，完全冷却后蘸取适量菌液（图 C），在含有相应抗生素的固体培养平板表面进行分区划线（图 D）；
- 2、将平板放在 37°C 培养箱中倒置培养 12-16h；
- 3、挑取平板上的单个菌落，接种于含有相应抗生素的液体培养基中（图 E），37°C，220rpm 震荡培养 12-16h；
- 4、取 650ul 新鲜菌液，加入 150ul 80%甘油，混匀，保存于-80°C；



菌液稀释涂板法

平板划线法

❖ 质粒的保存及使用

普舟基因提供含有目的基因的重组质粒，一般总量约为 2~5μg，通常有以下几种方式：

- 1、真空冷冻干燥后质粒：干燥后的质粒在离心管底部一般呈薄膜状或是无色透明，使用前请小心开启，以免丢失质粒。建议用 20~50μl 灭菌后的双蒸水或 pH8.0 的 1*TE 缓冲液来溶解，溶解后的质粒浓度约为 100 ng/μl。
- 2、液体质粒：可根据实验需求直接使用，若提供的质粒是已经去内毒素抽提，则可直接进行细胞转染；
- 3、滤纸质粒：质粒溶解后，滴在滤纸上，主要是方便运输。使用方法如下：A、在超净工作台将滤纸画圈部分剪下（多剪一点），然后剪碎；B、将剪下的滤纸放入 EP 管中；

C、用 50ul TE 或双蒸水浸泡半小时后离心集液；

4、溶解后的质粒若长期不使用请于-20℃保存，并请避免反复冻融以防质粒降解；

❖ 质粒的扩增

若实验过程中需要更多的质粒，需取新鲜的菌液，进行质粒抽提。新鲜菌液可来自菌种的活化，也可以用质粒转化后获得。

➤ 菌种活化抽提法

通过上述任一种菌种活化方法获得新鲜的菌液，根据实验需求，选择合适的试剂盒进行质粒抽提，即可获得想要量的质粒。

➤ 质粒转化后抽提法

- 1、将质粒转化入大肠杆菌感受态细胞。质粒用量及转化方法请按照感受态细胞的使用说明书进行；
- 2、从固体培养平板上，挑取单个菌落接种于适量含有相应抗生素的液体培养基中，37℃，220rpm 震荡培养 12-16h；
- 3、根据实验需求，选择合适的试剂盒进行质粒抽提，即可获得想要量的质粒。

❖ 发货报告

您所收到的质粒合成/构建服务的发货报告为压缩文件。共含的文件可能有如下：

- 1、Seq 格式文件：根据您提供订单序列生成的目的基因序列文件，可以使用 DNASTAR 或是 TXT 文本查看。
- 2、Abi 或 ab1 格式文件：测序彩图文件，该文件可以使用 Chromas 软件查看。
- 3、SQD 格式文件：将目的基因序列(Seq)和测序结果(abi 或 ab1)比对得到的 Alignment 文件，该文件可用 DNASTAR 软件查看。

❖ 注意事项

- 1、培养时使用的抗生素必须跟菌液或质粒产品标签上的抗生素一致，否则菌种无法生长；
- 2、菌体活化操作必须在超净工作台内进行，并严格遵守无菌操作规范，防止噬菌体等污染；

❖ 主要试剂的配制

◆ LB 液体培养基

将 10g 胰蛋白胍(Tryptone)、5g 酵母提取物(Yeast extract)、10g 氯化钠(NaCl)充分溶解于适量水中，用 1N NaOH 调节 pH 值 7.5 左右，定容 1L，121℃ 灭菌 20min。于 4℃ 储存，储存时间不超过 2 周。使用前加入所需抗生素。

◆ LB 固体培养基

将 10g 胰蛋白胍(Tryptone)、5g 酵母提取物(Yeast extract)、10g 氯化钠(NaCl)充分溶解于适量水中，用 1N NaOH 调节 pH 值 7.5 左右，加入 15g 琼脂粉，定容 1L，121℃ 灭菌 20min。待冷却至 50℃ 左右时加入所需抗生素，混匀后铺入无菌平皿，使其凝固，于 4℃ 储存，储存时间不超过 2 周。

◆ 100ml/ml 氨苄青霉素

将 1g 氨苄青霉素充分溶于 10ml 水中，用 0.22um 滤膜除菌，小管分装，后于-20℃ 保存。使用时以 1: 1000 比例加入培养基中。

◆ 50mg/ml 卡那霉素

将 0.5g 卡那霉素充分溶于 10ml 水中，用 0.22um 滤膜除菌，小管分装，后于-20℃ 保存。使用时以 1: 1000 比例加入培养基中。

◆ 80%甘油

向 80ml 甘油中加水定容至 100ml，充分混匀，121℃ 灭菌 20min，4℃ 储存。