

## 质粒使用说明书

### 质粒说明：

您好，根据签订服务内容，本公司向客户提供的质粒量一般为 10ug（-20℃保存），甘油菌 500ul（-70℃保存）。公司提供的质粒量可供数次少量实验，如需进行质粒扩增，请参照质粒扩增操作进行扩增。

### 使用说明：

质粒的使用方法及使用量，请参照转染试剂说明书进行。

### 质粒扩增：

#### 1. 摇菌操作

取出提供的甘油菌，了解其抗性种类后，按照您的质粒需求量进行摇菌操作；以抽提 50ug 氨苄抗性质粒为例：

##### 1.1 试剂制备：

制备 100mg/ml 的氨苄青霉素溶液（使用时按 1:1000 稀释使用）、LB-氨苄抗性平板、LB 培养基。

##### 1.2 菌种活化：

取出一块制备好的 LB-氨苄抗性平板，用菌液在平板上划线，若操作不熟练可将菌液按照 1:200 稀释后取 100ul 涂板，只要过夜培养后平板上可挑取到单菌落即可（若想省略此步骤直接用甘油菌摇菌，可直接吸取甘油菌，按照甘油菌：摇菌体系=1:100 进行摇菌）。

##### 1.3 摇菌：

1.3.1 打开超净工作台的紫外灯，照射 15min，同时拿出一支 100mg/ml 的氨苄青霉素溶液于冰上融化；

1.3.2 取 2 支 12ml 摇菌管，标记好样品名称后每支摇菌管中加入 6ml 已灭菌的 LB 培养基和 6ul 氨苄青霉素溶液（12ml 的摇菌管加液量不可超过 6ml，如需要更大量质粒可增加摇菌管支数）；

1.3.3 从菌种活化平板上挑取 2 个单克隆菌落按照摇菌管上的标记接种到相应的摇菌管中，同时把 200ul tips 也打入摇菌管中便于培养时溶氧；

1.3.4 盖上摇菌管的盖子，注意不要拧紧。将摇菌管于 37℃，200rpm 振荡培养 12-15h 后达到菌液最佳生长状态（一般 OD<sub>600</sub> 约为 0.6），即可用于质粒抽提。

#### 2. 质粒抽提操作

培养过夜的菌液，次日进行质粒小提操作（详见您选用的质粒抽提试剂盒的说明书）。抽提后测定质粒的浓度，其中 260/280 的值应在 1.8-2.0 之间，否则抽提的质粒可能不纯，质粒使用前如有需要可进行琼脂糖凝胶电泳操作。

### 3. 琼脂糖凝胶电泳操作

若您第一次或者很少进行质粒抽提操作，强烈建议抽提后进行琼脂糖凝胶电泳操作，检测质粒品质（以超螺旋形态为最佳，线性化状态为最次，凝胶电泳可将其分开）。操作步骤：

#### 3.1 试剂配制

##### 3.1.1 配制 0.5xTAE buffer (50x TAE buffer 用双蒸水做 50 倍稀释)。

例：配制 1L 0.5x TAE buffer

试剂名称	使用量 ( ml )
50xTAE buffer	10
双蒸水	990
总量	1000

##### 3.1.2 配制琼脂糖凝胶

例：配制 50ml 1%琼脂糖凝胶

试剂名称	使用量
琼脂糖	0.5g
0.5x TAE buffer	50ml
总量	50ml

- 洁净的制胶板中，放入制胶托盘并插上孔梳；
- 溶解琼脂糖粉于 250ml 锥形瓶中，将锥形瓶置于微波炉中用中高火加热，沸腾后取出摇匀，再放进微波炉加热，反复三次，至溶液完全澄清透明无颗粒状物；
- 待上述琼脂糖溶液室温冷却 5min 后，滴加 5ul 10000x GeneGreen Nucleic Acid Dye(TIANGEN RT210)，轻柔摇匀，避免产生大量气泡；
- 将融好的琼脂糖倒入制胶板中，室温静置约 30min，待其自然冷却凝固（制胶过程中避免产生气泡）。

#### 3.2 上样电泳

3.2.1 向洁净的电泳槽中倒入约 300ml 0.5x TAE buffer；

3.2.2 双手垂直向上拔去制胶板上的孔梳（小心，勿破坏胶孔），去掉底部和四周多余的碎胶后放入电泳槽，使电泳液淹没胶块（若没有淹没，可补加 0.5x TAE buffer 至淹没为止），胶孔一端对应电泳槽的负极（即黑色端）；

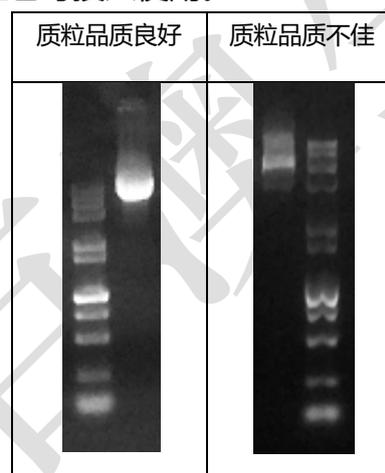
3.2.3 在洁净的一次性 PE 手套上滴加 2 个 2ul DNA loading buffer 点，分别将抽提的两管质粒取 500ng 与 loading 点混匀；

3.2.4 按顺序向电泳胶孔中添加 5ul DNA Marker 和混有 DNA loading buffer 的 DNA 样本，操作期间动作需轻柔，避免样品漏出胶孔，造成孔间污染等意外情况的出现；

3.2.5 盖上电泳槽盖，调节稳压电源至电压 120V，时间 30min，进行电泳。电泳结束后，将胶块取出放于凝胶成像仪中拍照保存；

### 3.3 结果分析

首先观察条带是否单一，若单一则质粒品质很好，再看大小位置是否正确，若大小也正确，则质粒可投入使用；若条带不单一，则可能出现两条或者三条，这说明质粒品质不佳，有线性化或者开环状态的质粒存在，此时用单限制性内切酶处理质粒后再电泳会只有一条带，若质粒大小也正确，则质粒也可投入使用。



## 4 注意事项

若客户在菌种活化或者摇菌过程中出现菌不生长的情况，可用本公司提供的质粒进行转化操作，涂板后挑取单克隆进行摇菌操作。

### 4.1 转化操作

4.1.1 将水浴锅打开，调温至 42℃；

4.1.2 打一盒碎冰，从-80℃冰箱取出感受态细胞（可直接购买），于冰上融化后，取 50ul 至新的已灭菌的 1.5ml 离心管中；

4.1.3 加入 1-2ul 质粒（体积不能超过 5ul），边加入边轻轻搅拌混匀，避免剧烈吹打产生气泡；

4.1.4 于冰上共同孵育 30min；

4.1.5 放于水浴锅中热激 90s，随后立刻放于冰上 2min；

## 4.2 涂板操作

4.2.1 打开超净工作台和酒精灯，将接种环进行灼烧灭菌，冷却备用；

4.2.2 转化结束后的的菌液加入 200ul 无菌 LB 培养基进行稀释，用接种环蘸取菌液后在氨苄抗性平板上划线；

4.2.3 在平板底部标明质粒名称及操作日期，放于 37℃细菌培养箱中倒置培养过夜；

4.2.4 次日，观察平板上菌落生长情况，挑取单克隆进行摇菌操作。

复百澳生物