

Inoue法制备大肠杆菌感受态

感受态是分子生物学的常规实验, 通过二价 Mn^{2+} 激活DNA摄入的通道蛋白, 并保留住该状态, 本Protocol是实验室保留Protocol

提前1天

1. 准备50 mL管1盒、黄/蓝枪头各1盒、1.5 mL管2盒, 高压蒸汽灭菌, 烘箱烘干, 用前一天放入4°C预冷
2. 配制LB培养基: 250 mL 3瓶、25 mL 1瓶
3. 准备Inoue转化缓冲液 (提前4°C或冰上预冷)

- 0.5 M PIPES(pH=6.7), 即哌嗪-N, N-双(2-乙磺酸)溶液(实验中需要2 mL, 配50 mL)

将7.55g PIPES($M_w=302.37$)溶于30 mL 18M Ω 水中, 用5 M KOH调pH值至6.7(使用量较大, 用高浓度的KOH溶液, 当pH高于5.6后才在水中溶解), 最后补水定容至50 mL, 超净台中用Nalgene滤膜(0.45 μ m孔径)过滤除菌, 1 mL分装于-20°C保存

- Inoue转化缓冲液的配制(实验中需要100 mL):

将下列固体组分溶于60 mL纯水中, 然后加2 mL 0.5 M PIPES (pH=6.7), 加纯水定容至100 mL, 用Nalgene滤膜(0.45 μ m孔径)在超净台中过滤除菌至灭菌的50mL管, 配置后放4°C预冷

试剂	取用量	终浓度
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (粉色固体)	1.09 g	55 mM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.22 g	15 mM
KCl	1.87 g	250 mM
PIPES(0.5M pH=6.7)	2 mL	10 mM
H ₂ O	补齐至100 mL	

4. 从-80°C拿出保留的菌种, 1:1000吸取25 μ L菌液接种至25 mL LB培养液中, 37°C摇床6-8 h, 180转(如若挑取单克隆则直接将其放到25 mL培养基中)
5. 晚上9点将上述初始培养物接种于三个盛有250 mL LB培养液中, 第一个加500 μ L, 第二个加1 mL, 第三个加2 mL, 18°C、180 rpm摇床, 12 h后测OD₆₀₀

实验当天

6. 早晨测量三瓶培养物的OD₆₀₀值, 每45min测定一次, 当有一瓶的培养物OD₆₀₀=0.55时(0.6以下), 将培养瓶置于冰上冷却10分钟后进行后续步骤, 弃去另两瓶培养物
7. 更换角转子4°C预冷大离心机, 将天平、吸水纸放入超净台中后开启紫外灭菌15分钟以上, 准备冰盒

！以下操作需严格在冰上进行

8. 将菌液、Inoue缓冲液放在冰上10 min以上确保冷却后进行
9. 将菌液分装在四个50 mL管中, 4°C, 4000 rpm, 离心10 min收集菌体, 每个管加约30 mL菌液配平, 共集菌两次
10. 在超净台中开盖倒掉培养液, 将离心管倒扣在吸水纸上, 吸干多余培养基
11. 剪蓝枪头, 每管加20 mL预冷的Inoue转化缓冲液, 轻轻旋转, 吹吸重悬, 混匀菌体沉淀
12. 配平, 4°C, 4000 rpm, 离心10 min收集菌体, 倒去上清缓冲液, 将离心管倒扣在吸水纸上, 吸干多余液体
13. 剪枪头后, 每管加入5 mL预冷的Inoue转化缓冲液轻轻重悬沉淀后, 合并为1管
14. 20 mL液体中加入1.5 mL DMSO (凝固点18.45°C, 不要放冰上), 轻轻吹吸混匀细菌悬液, 冰上放置10 min, 期间用泡沫盒准备液氮
15. 剪黄枪头, 迅速将悬液分装到预冷、灭菌的1.5 mL离心管中, 每管110 μ L, 封闭管口, 没入液氮中快速冰冻, 用长柄镊子夹取出来后, 做好标记储存于-80°C备用

感受态细胞效率检测

1. 同时做三组实验:
 - 以同体积的无菌双蒸水代替DNA溶液, 其它操作与上面相同, 涂于含Kan/Amp的平板
 - 以同体积的无菌双蒸水代替DNA溶液, 涂板时取5 μ l 菌液涂于不含抗生素的LB平板上
2. 统计每个平板中的菌落数。正常情况下应在含抗生素的LB平板上应没有菌落出现, 无抗平板上应产生大量菌落
3. 计算转化频率

$$\begin{aligned} \text{转化子总数} &= \text{菌落数} \times \text{稀释倍数} \times \text{转化反应原液总体积} / \text{涂板菌液体积} \\ \text{转化频率(转化子数/每ug质粒DNA)} &= \text{转化子总数} / \text{质粒DNA加入量(ug)} \\ \text{感受态细胞总数} &= \text{无抗板菌落数} \times \text{稀释倍数} \times \text{菌液总体积} / \text{涂板菌液体积} \\ \text{感受态细胞转化效率} &= \text{转化子总数} / \text{感受态细胞总数} \end{aligned}$$

- 当转化频率达到 10^8 时, 可用于gateway产物的转化
- 当转化频率达到 10^7 时, 可用于连接及T5等产物的转化
- 若转化频率只达到 10^6 时, 只可用于质粒的转化

修订日期 2023-10-08