

吉满生物

质粒操作手册

Genomeditech

产品介绍

尊敬的客户：

您好！感谢您对我公司的信赖与支持。为了让您更加方便，更加准确的使用我公司提供的服务，请您阅读以下服务说明：

质粒：

1、我公司提供的质粒总量约为 10ug，因运输条件、仪器不同，实际浓度与标定浓度会有上下浮动。建议您在使用前重新标定浓度。

2、质粒样品若长期不使用请于-20℃或-80℃保存，并避免反复冻融以防质粒降解。

3、提供的质粒满足一般的分子生物学实验要求，如 PCR 扩增、酶切连接、质粒转化和质粒 DNA 测序等。

甘油菌：

我公司同时提供一管含有目的基因重组质粒的甘油菌约 500uL 备用。

1、甘油菌可室温保存，保存周期约为 1-2 天，也可-20℃保存，保存周期约为半年。

2、甘油菌的使用：根据质粒抗性进行扩大培养，先加入一定量的抗生素，再吸取 100-200uL 甘油菌接种到 10ml-50ml 液体培养基中摇床过夜扩大培养。

发货报告：

您所收到的载体构建及测序报告是 RAR 格式的压缩文件。报告共含的文件信息如下：

1、Seq 格式文件——测序后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，该文件可使用 Chromas 软件查看。

3、PDF 或 word 格式文件——此类文件为构建报告。

使用说明

1、离心：

使用前请先瞬时离心，避免外界因素（包括酶，极端 PH 或者温度条件等）导致产品降解，所有操作请在冰盒上操作，使用完毕后请于-20℃~-80℃保存。

2、质粒转化：

- 1) 取 1-3u1 质粒样品加入融化后的感受态细胞（stb13, sigma, 融化后置于冰盒内），用枪头轻轻混匀（不要吹打）。放入 4℃冰箱内，冰浴 25min，同时将含目标抗性培养皿放入 37℃温育。
- 2) 准备冰水混合物。
- 3) 4℃冰浴结束后，取出感受态，放入 42℃水浴锅，热激 60s，立刻置于冰水混合物中，冰浴 3-5min。
- 4) 每管感受态内加入 500u1 预先配置的 SOC 培养基，放入 37℃摇床复苏 45min。
- 5) 复苏结束后，将复苏后的细胞放入离心机内，3000rpm 3min；取出温育好的培养皿，做好标记。
- 6) 将离心后的细胞小心取出，吸取上清液弃置，只留 100u1 左右。将沉淀的细胞和剩余的上清液吹打混匀。
- 7) 将混匀后的细胞置于培养皿中，用涂布棒涂匀，待水分吸收后，平板放置于 37℃培养箱内倒置过夜培养培养 16h。
- 8) 挑取单克隆，置于 2ml 液体培养基中 37℃震荡培养。9 小时后，到菌液浑浊时，可补加培养基大摇，第二天进行转染级质粒大量抽提，或取 1ml 加 180u1 的 70%甘油保种，混匀后-80℃保存。

备注：补加培养基大摇接菌比例：

总摇菌量（ml）	10	250	1000
接菌体积（u1）	100	500	2000
总质粒抽提量（ug）	5-20	100-1000	1000-10000

（注：抽提操作可按质粒抽提说明书进行，如不具备质粒转化条件可直接用我公司提供的 500u1 甘油菌进行摇菌扩大培养后抽提质粒）

3、转染级质粒转染实验（293T）

第一天：

将已经长好的细胞以合适比例传代到培养皿中，当第二天细胞长到70%-80%时准备转染。

第二天：

1) 转染前 2h 将需要转染的细胞换新鲜的培养基。注意：293T 细胞贴壁性不是很好，换液时应小心滴加尽量避免冲起细胞。

2) 转染，取无菌的 1.5ml EP 管或 15ml 离心管，转染体系按下表：

细胞培养容器	表面积 (cm ²)	DNA 转染		核酸转染试剂混合稀 释液总体积（每孔）	培养基总体 积（每孔）
		DNA	HG_TransGene		
96-well	0.3	0.1ug	0.25ul	25ul	100ul
24-well	2	0.4ug	1.0ul	50ul	500ul
12-well	4	0.8ug	2.0ul	100ul	1ml
6-well	10	2ug	5.0ul	250ul	2ml
60-mm/T25 flask	20	4ug	10ul	0.5ml	4ml
100-mm/T75 flask	60	12ug	30ul	1.5ml	12ml

a) 以 24 孔板为例，将 0.4ug 转染级质粒 DNA 用 50ul 的无血清培养基稀释，并混合均匀。（无血清培养基可选择 OPTI-MEM 或无血清 DMEM）。

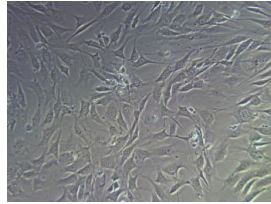
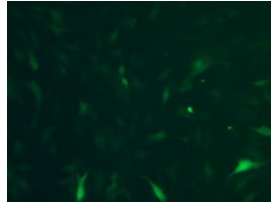
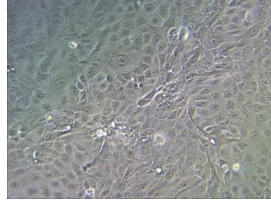
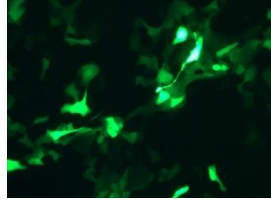

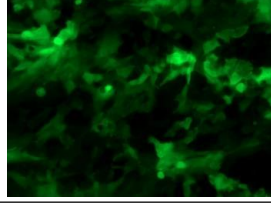
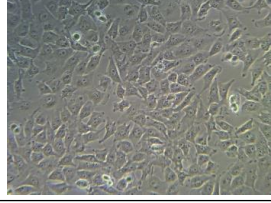
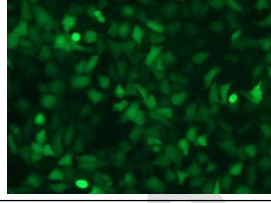
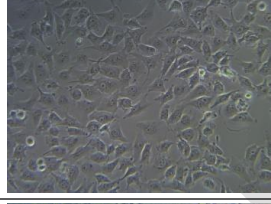
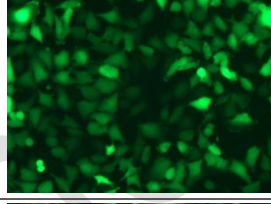
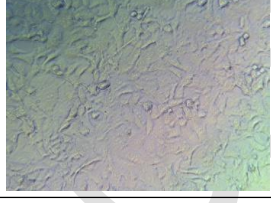
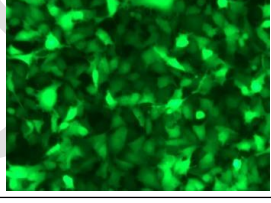
b) 吸取 1.0ul 的 HG-Trans293T transfection reagent 加入步骤 a 混合好的 DNA 稀释液中，混合均匀，室温静置 30min，核酸-转染试剂复合物制备完成。

c) 将制备好的核酸-转染试剂复合物加入到含细胞和完全培养基的培养孔中，水平方向上下左右轻轻晃动培养板，使其混合均匀。（本转染试剂适用于含血清的完全培养基，可有助于提高细胞的转染效率和存活率）

d) 放置 37℃ 细胞培养箱培养，4-6h 换液，然后继续培养 18-48h 后荧光显微镜下检测转染效率。

（注：转染操作可进一步参考转染试剂说明书）

4、转染效果对照表

明场	荧光	适用范围
		可用于 3' UTR Luc 检测。 不可用于验证过表达效果。 不可用于验证 shRNA 效果。
		可用于 Luc 检测。 不可用于验证过表达效果。 不可用于验证 shRNA 效果。
		可用于 Luc 检测。 可用于验证过表达效果(低本底表达)。 不可用于验证 shRNA 效果。
		可用于 Luc 检测。 可用于验证过表达效果。 不可用于验证 shRNA 效果。
		可用于 Luc 检测。 可用于验证过表达效果。 用于验证 shRNA 效果时，仍有风险。
		可用于 Luc 检测。 可用于验证过表达效果。 可用于验证 shRNA 效果。