

质粒产品使用说明

一、菌种活化（扩增）

公司提供菌种为大肠杆菌甘油菌，由于运输等原因，收到菌种应尽快活化菌种（一周内），重新制备菌种并保藏。建议使用平板划线法进行菌种活化和扩增，此方法可获得活力更高的菌体。也可以使用直接接种法，优点是简便、省时，但活化成功率、质粒浓度可能会略低于前方法。

1. 菌液稀释涂板法

- 菌液混匀后设计梯度进行稀释，分别稀释至100、1000、10000倍。
- 取10ul-15ul稀释后的菌液分别均匀涂布到含有正确抗生素（氨苄、卡那等）的固体培养平板表面，于37℃培养箱中倒置培养12-16h。
- 挑取单菌落，接种于含有正确抗生素的液体培养基中，37℃，220rpm，振荡培养12-16h，然后进行质粒提取。
- 菌种保藏：取600ul新鲜菌液，加入150ul 80%甘油，充分混匀后保存于-80℃，保留好菌种无需重新订购。

2. 平板划线法（推荐方法）

- 接种环在酒精灯上灼烧灭菌，完全冷却后蘸取适量菌液，在含有正确抗生素的固体培养平板表面进行分区划线。
- 将平板放在37℃培养箱中倒置培养12-16h。
- 挑取平板上单个菌落接种于含有正确抗生素的液体培养基中，37℃，220rpm，振荡培养12-16h，然后进行质粒提取。
- 菌种保藏：取600ul新鲜菌液，加入150ul 80%甘油，充分混匀后保存于-80℃，保留好菌种无需重新订购。

3. 直接接种法

- 按照0.5-1%的接种比例，取适量菌液，加至含有正确抗生素的液体培养基中，37℃220rpm，振荡培养12-16h，然后进行质粒提取。
- 菌种保藏：取600ul新鲜菌液，加入150ul 80%甘油，充分混匀后保存于-80℃，保留好菌种无需重新订购。

二、质粒扩增

科研级质粒，可直接用于转化、转染等操作，质粒提取参考质粒提取试剂盒说明书。

1. 菌液活化抽提法

通过“菌种的活化”的方法获得新鲜菌液，选择合适的质粒提取试剂盒，根据实验需求**摇菌扩大培养菌液**进行质粒的大提或者小提。

2. 质粒转化、抽提步骤

- 用冰盆盛满冰，从-80℃冰箱，取一支大肠杆菌化转感受态（100ul）放置冰中。
- 待感受态融化后，用移液枪吸取1ul质粒加入感受态中，用手拨3-5下感受态管壁，混匀样品和感受态细胞，冰上静置15min。
- 42℃金属浴，热激1min，冰上迅速预冷2min，在超净工作台中加入800ul无抗培养基。
- 恒温振荡仪37℃，600r/min，恒温振荡孵育45min。
- 12000r/min，离心30s，使菌体沉淀，在细菌超净工作台中，倒掉上清液，用200ul移液枪吹打混匀，吸取菌液，注入相应抗性平板凝胶面，把移液枪头在平板盖子内侧折弯，用折弯的枪头在凝胶面水平转动，使菌液涂布均匀（备注：平板提前30min放置于37℃恒温培养箱中30min使平板预热）。
- 37℃恒温培养箱倒置培养过夜。

备注：常见普通真核表达骨架质粒选择DH5a感受态；慢病毒，腺病毒，腺相关病毒骨架质粒选择 stbl3感受态；含有ccdB毒性基因的载体，选择DB3.1感受态，原核表达载体做蛋白纯化选择BL21感受态。

g. 挑斑摇菌：每个平板挑取2-3个单克隆，接入8mL含相应抗性的LB培养基内，37℃，220rpm摇床振荡培养过夜。

h. 质粒提取：根据质粒抽提试剂盒操作步骤进行质粒抽提。

三、质粒转染（仅供参考，具体要以实际购买的转染试剂说明为准）

1. 目的细胞质粒转染预实验

培养生长状态良好的目的细胞，质粒转染前一天将目的细胞分入6-well 培养板培养，未做过质粒转染的细胞可以通过转染荧光对照质粒进行转染预实验，摸索出来最佳质粒和转染试剂的配比。转染24h后荧光显微镜下观察荧光表达情况，荧光率最好达到80%以上，如果目的质粒不带荧光，也可以通过抗性筛选方法来判断即加抗生素后观察细胞的存活比例，质粒真核抗性常为neo、puro，加相应的抗生素即可。

2. 目的细胞质粒转染(以6孔板为例)

2.1 对数生长期的细胞制成细胞悬液，计数，接种于适合的细胞培养板中37℃、5% CO₂ 培养箱培养至细胞融合度达到约60-70%。

2.2 质粒DNA稀释：将2μg质粒DNA加入Opti-MEM培养基中，稀释后的终体积为50μL (2μg÷质粒浓度+V_{Opti-MEM}培养基)。

2.3 转染试剂稀释：取4uL的Ms-D Transfection Reagent转染试剂加入到46uL的Opti-MEM培养基中稀释后总体积为50uL。

2.4 转染复合物制备：将上述质粒DNA稀释液和转染试剂稀释液混合，轻轻吹打均匀后，室温静置10-15min。

2.5 转染：将上述复合物加入细胞培养孔板中，轻轻吹打混匀，继续培养18-48h后检测转染效率，无需更换培养基。

2.6 4-6 h后观察细胞状态，细胞状态没问题，可以适当延长细胞培养的换液时间。如果载体携带荧光标签转染24-48h后观察荧光表达情况，收集细胞提取RNA（转染后24-48h）做qpcr检测或提蛋白做WB检测（转染后48-96h）。

表1 转染试剂Ms-D Transfection Reagent DNA转染方案（供参考）

孔板	孔面积	接种培养基	质粒量/孔	质粒稀释后总体积	转染试剂量/孔	转染试剂稀释后总体积
96	0.3cm ²	200uL	0.2ug	5uL	0.4uL	5uL
24	2.0 cm ²	500uL	0.5ug	10uL	1.0uL	10uL
12	4.0cm ²	1mL	1ug	20uL	2.0uL	20uL
6	10.0cm ²	2mL	2ug	50uL	4.0uL	50uL
60mm	20.0cm ²	5mL	4ug	0.1mL	8.0uL	0.1mL

稀释液建议用：Opti-MEM（非必须）

四、常用抗生素（推荐使用进口抗生素）

100mg/ml 氨苄青霉素（ampicillin）：将 1g 氨苄青霉素充分溶解于 10ml 水中，0.22 μm 滤膜除菌，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（kanamycin）：将 0.5g 卡那霉素充分溶解于 10ml 水中，0.22 μm 滤膜除菌，分装后于-20℃保存，使用时以 1:1000 比例加入培养基中。

注意事项：

- 转染前细胞必须处于良好的生长状态。
- 不同品牌转染试剂质粒与转染试剂配比不同，转染条件需以购买转染试剂使用说明为准。
- 需自备不含抗生素的无血清培养液或Opti-MEM®培养液或普通的DMEM培养液。
- 为获最佳转染效果，实验需调整转染试剂、质粒用量优化配比体系（一般6孔板质粒量2-4微克/孔、转染试剂在4-8uL之间调整）。
- 同一种转染试剂对不同细胞转染能力不同，一旦转染效率不佳，需更换转染试剂。
- 公司提供质粒为液体质粒，非冻干粉，质粒量根据实际质粒浓度计算。

转染试剂、CAS9 敲除细胞株、siRNA 定制靶点合成、siRNA 三保一、mimics、inhibitors、agomir、antagomir、过表达质粒、沉默 shRNA 质粒、过表达慢病毒、沉默慢病毒、过表达 AAV、沉默 AAV、过表达腺病毒、沉默腺病毒、双荧光素酶报告质粒、cas9 基因敲除、cas9 转录激活、抗体、Elisa 试剂盒、血清、培养基、细胞