

### 制备感受态的技术心得

- 1: 要注意每次做感受态要摇过也菌, 最重要的是在摇菌的过程千万不要被污染。
- 2: 其次是摇菌, 要菌并不需要按照一定比例接, 最重要的是收菌时候的 OD600 的值。这是极其重要的, 也是很容易被大家忽略的问题, 一般 OD 值达到 0.42-0.48 收菌是最好的。

其次是方法:

我做的方法是经过分子克隆上的 INOUE 法 我做的有和他不同, 而且是提高转化效率的主要关键, 就是在最后一步是在菌液里加入 0.1 M 氯化钙 再加入甘油 终浓度为百分之 1 4 进行保重, 在这里我就不做详细介绍了

我最后一步就是用 0.1M cacl<sub>2</sub> 重旋保种,

最近我做了连接转化的摸索实验,

判定 1: 将片段和载体共同放入 37 度水浴 1min 以上.

2: 只将片段放入 37 度水浴 1min 以上, 载体放再冰上,

这样连接出来的转化效率比平常要高 4-6 倍, 反映体系中最好是有水, 先把水和连接酶, 连接 buffer 加再一块, 再把载体和片段放在一块, 最后再把两种混合物加再一块. 最后还是 16 度连接. 大概 6 个小时就 ok 啦哈!

这样做出来的连接转化率很高, 虽然不知道阳性率有多少! 这也是我要下一步做的摸索, 估计明天才会有结果.