

# 产品使用说明书

## Product Manual

### SOC 培养基

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN230600
中文名称	SOC 培养基
英文名称	SOC Medium
产品别名	SOC 液体培养基、SOC 肉汤
用途	用于基因工程菌大肠杆菌培养、限制性片段长度多态性技术分析污水处理系统中微生物多样性等实验
配方出处	徐爱玲 宋志文等.2017.环境工程微实验技术.北京:中国电力出版社
<b>成分 (g/L) :</b>	
胰蛋白胍 Tryptone	20.0
酵母浸粉 Yeast Extract Powder	5.0
氯化钠 NaCl	0.5
氯化钾 KCl	0.186
氯化镁 MgCl	0.95
硫酸镁 MgSO <sub>4</sub>	1.2
葡萄糖 Dextrose	3.6
pH	7.0±0.2(25℃)
<b>用法:</b>	
称取本品 31.44g,加入 1000mL 蒸馏水溶解,分装,115℃高压灭菌 15 分钟。	
<b>相关产品:</b>	
SOC 培养基 LB 琼脂(Miller)	
<b>实验方法与步骤 (供参考) :</b>	
实验名称: 限制性片段长度多态性技术分析污水处理系统中微生物的多样性	
实验材料:	
1、材料	
样品:采集某污水处理厂二沉池回流污泥中的活性污泥为研究样本。	

菌种:感受态大肠杆菌。

## 2.溶液或试剂

SLX mlus 缓冲液、DS 缓冲液、SP2 缓冲液、异丙醇、Elution Buffer、HTR 溶液、XP2 Buffer、XP2 缓冲液、无水乙醇、SPW 洗脱液、PCR 反应体系、1%琼脂糖、Bindin Buffer、Wash buffer、连接反应体系、100mg/mL 氨苄青霉素(Ampicillin,Amp)、X-gal(4%)和 30 $\mu$ L IPTG(0.1mol/L)、TE 缓冲液、菌落 PCR 体系、酶切反应体系。

## 3.培养基

SOC 培养基、LB 琼脂(Miller)。

## 4.仪器或其他用具

PCR 扩增仪、电泳仪及电泳槽、水浴锅、冰箱、紫外仪、制冰机、恒温箱、Spin column、HiBind DNA Column、离心管、滤纸等。

### 实验步骤:

#### 1. 样品总 DNA 的提取

(1)取活性污泥样品 50g 和 135mL 的 DNA 提取缓冲液加入到 150mL 离心管中,置 37°C 下充分混合 0.5h, 浓缩其中微生物于 2mL 离心管, 作为实验样品。

(2)向上述处理好的实验样品中加入 1mL SLX mlus 缓冲液, 并用旋仪最大速度涡 3~5min.

(3)加入 100 $\mu$ L DS 缓冲液, 并涡旋使其混匀。

(4)用水浴锅于 70°C水浴 10min, 其间将离心管上下颠倒混匀一次。

(5)室温离心 2min, 转移 800 $\mu$ L 上清液至新的 2mL 离心管中, 并加入 270 $\mu$ L SP2 缓冲液, 涡旋使其充分混匀。

(6)5000r/min 离心 5min。

(7)小心转移上清液至新的 2mL 离心管中, 并加入 0.7 体积异丙醇, 上下颠倒混合 20~30 次, 置于-20°C冰箱中 1h。

(8)4°C离心 10min, 沉淀 DNA。

(9)小心倒掉上清液, 确保不搅动 DNA 沉淀, 将离心管倒置于滤纸上 1min, 吸掉液体, DNA 沉淀不需干燥。

(10)加入 200 $\mu$ L Elution Buffer 于上述离心管中, 涡旋 10min, 用水浴锅于 65°C温育 20min, 溶解 DNA 沉淀。

(11)加入 50~100 $\mu$ L HTR 溶液于上述离心管中, 并涡旋 10min 使其充分混匀。

(12)室温下温育 2min, 5000r/min 离心 2min。

(13)转移上清液至新的 2mL 离心管中。

(14)加入等量 XP2 Buffer 于上述离心管中, 并涡旋使其充分混匀。

(15)将 HiBind DNA Column 插入配套的 2mL 收集管中, 将步骤(14)中的样品转入其中, 室温下 5000r/min 离心 1min, 倒掉直流液, 收集管重复利用。

(16)加入 300 $\mu$ L XP2 缓冲液于上述离心管中, 5000r/min 离心 1min, 弃掉直流液和收

集管。

(17)将 HiBind DNA Column 置于新的 2mL 收集管中, 并加入 700 $\mu$ L 用无水乙醇稀释的 SPW 洗脱液, 5000r/min 离心 1min, 弃掉直流液, 收集管重复利用。

(18)重复步骤(17)。

(19)弃掉直流液和收集管, 将 HiBind DNA Column 重新插入新的收集管中, 室温下 5000r/min 离心 2min, 除去残留乙醇。

(20)将 HiBind DNA Column 置于新的 1.5mL 灭菌离心管中, 加入 30 $\mu$ L Elution Buffer 于 HiBind DNA Column 中心, 用水浴锅于 65 $^{\circ}$ C 下温育 15min。

(21)12 000r/min 离心 1min, 洗提 DNA。

## 2. 16S rDNA PCR 扩增

(1)PCR 反应体系: ddH<sub>2</sub>O 19 $\mu$ L、上游引物(5 $\mu$ mol/L)2 $\mu$ L、下游引物(5 $\mu$ mol/L)2 $\mu$ L、DNA 2 $\mu$ L、Mix25 $\mu$ L, 总体积 50 $\mu$ L。

(2)将配制好的 PCR 反应体系置于掌上离心机, 离心使其充分混匀。

(3)将离心后的 PCR 体系于 PCR 仪中进行聚合酶链式反应。其中,

16S rDNA 聚合链式反应条件:

94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 58.5 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 完成 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min; 4 $^{\circ}$ C 下保存。

18S rDNA 聚合酶链式反应条件:

94 $^{\circ}$ C 预变性 5min、94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 53 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 完成 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

(4)用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。正常情况下, PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱为一条均一且清晰的亮带。

## 3. 特异性片段回收纯化

(1)用紫外仪观察 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱, 选取均一且较亮条带进行胶回收即切割含有特异性片段的琼脂糖, 并将其置于已称重的 1.5mL 离心管中。

(2)向上述离心管中加入 Binding Buffer(1g 琼脂糖加入 1mL Binding Buffer), 用水浴锅于 50~60 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 使琼脂糖凝胶完全溶解。

(3)将一个 Spin column 放入试剂盒配备的 2mL 收集管中, 转移步骤(2)中液体于 Spin column, 12000r/min 离心 1min, 弃去直流液。

(4)加入 300 $\mu$ L Binding Buffer 于上述 Spin column 中, 12 000r/min 离心 1min, 弃去直流液。

(5)加入 700 $\mu$ L Wash buffer 于上述 Spin column 中, 12 000r/min 离心 1min, 弃去直流液。

(6)重复步骤(4)。

(7)12000r/min 离心 2min, 除去残留乙醇。

(8)将上述 Spin column 置于新的 1.5mL 灭菌离心管中, 并加入 30 $\mu$ L Elution buffer,

室温静置 1min, 12 000r/min 离心 1min, 得到纯化 PCR 产物。

#### 4.目的片段和载体连接

(1)配制连接反应体系, 见下表:

成分	体积(μL)	成分	体积(μL)
ddH <sub>2</sub> O	4.5	T 载体(质粒)	1
5x Ligation buffer	2.5	纯化 PCR 产物	1
T4 DNA ligase	1		
总体积	10μL		

(2)将配制好的连接反应体系置于掌上离心机, 离心使其充分混均。

(3)将离心后的连接反应体系于 PCR 仪中进行连接反应。反应条件:22°C 1h, 4°C 12~16h。

#### 5.转化

(1)用制冰机制备所需要的冰。

(2)于-80°C冰箱取出感受态大肠杆菌, 并迅速置于上述冰上, 使其缓慢融化。

(3)待感受态大肠杆菌融化后, 取 50μL 于新的 1.5mL 灭菌离心管中, 并加入 5μL 连接产物, 冰育 30min。

(4)42°C热激 90s。

(5)热激后迅速置于冰上,冰育 2.5min, 然后加入 470mL SOC 培养基。

(6)37°C摇床活化培养 1h。

(7)LB 固体培养基灭菌后, 待其自然凉至 60°C时, 加入适量 100mg/mL 氨青霉素 (Ampicillin、Amp), 使其终浓度保持 50μg/mL, 然后制备平板。

(8)取 30μL X-gal(4%)和 30μL IPTG(0.1mol/L), 加入步骤(6)所述离心管中,用移液枪反复吸打混匀。

(9)吸取 150μL 上述混合液, 涂布于制备好的平板上。

(10)待平板表面液体全干, 将其倒置于 37°C恒温箱中培养 16h。

(11)观察培养结果、并将长出大肠杆菌的平板置于 4°C冰箱, 使假阳性菌落变蓝, 便于蓝白斑筛选。

#### 6.蓝白斑筛选

(1)制备含 Amp 的 LB 固体培养基平板, 制备方法同 5 步骤(7)。

(2)对 5 步骤(11)所述平板菌落进行蓝白斑筛选, 即用灭菌牙签挑取白色菌落, 有规律地置于上述制备好的平板上, 并倒置于 37°C恒温培养箱中, 培养 16h。

(3)观察培养结果, 并准备下一步实验(如果不及及时进行下一步实验, 需要将其置于 4°C冰箱中保存)。

#### 7.菌落直接聚合酶链式反应(PCR)

(1)按照 6 步骤(3)所述平板菌落编号。

(2)向 96 孔板中加入 TE 缓冲液, 每孔 50 $\mu$ L, 并用枪头挑取相应编号菌落置于其中制备裂解反应体系。

(3)将上述裂解反应体系于 PCR 仪中进行裂解反应, 反应条件:98 $^{\circ}$ C10min。

(4)配制菌落 PCR 体系, 下表:

成分	体积( $\mu$ L)	成分	体积( $\mu$ L)
ddH <sub>2</sub> O	7	DNA(裂解产物)	1
M13/PUC R	1	Mix	10
M13/PUC F	1		
总体积	20 $\mu$ L		

(5)将配制好的菌落 PCR 体系置于掌上离心机, 离心使其充分混匀。

(6)将离心后的反应体系于 PCR 仪中进行聚合酶链式反应, 反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C变性 45s, 53 $^{\circ}$ C退火 45s, 72 $^{\circ}$ C延伸 90s, 完成 36 个循环;72 $^{\circ}$ C延伸 10min;4 $^{\circ}$ C下保存。

(7)用 1%琼脂糖凝胶电泳检测菌落 PCR 产物, 正常情况下, 其琼脂糖凝胶电泳图谱为一条均一旦清晰的亮带。

### 8.限制性核酸内切酶酶切反应

(1)根据菌落 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱, 选取能够满足酶切反应要求的 PCR 产物进行酶切反应。

(2)配制酶切反应体系, 见下表:

成分	体积( $\mu$ L)	成分	体积( $\mu$ L)
ddH <sub>2</sub> O	5.25	内切酶 HhaI/RsaI	0.25
10x 酶切缓冲液	1	PCR 产物	3.5
总体积	10 $\mu$ L		

(3)将配制好的酶切反应体系置于掌上离心机, 离心使其充分混匀。

(4)将离心后的酶切反应体系于 PCR 仪中进行酶切反应, 反应条件:37 $^{\circ}$ C20min; 80 $^{\circ}$ C 5min;4 $^{\circ}$ C下保存。

(5)3%琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段。

(6)用凝胶成像系统对酶切产物琼脂糖凝胶电泳结果拍照, 得到酶切图谱。

### 9.酶切图谱分析

(1)分析酶切图谱, 根据电泳条带位置、数目和信号强度异同进行分类单元划分(OTU)

(2)各 OTU 中任选一个克隆子进行测序。

### 10.测序

(1)配制含 Amp(50 $\mu$ g/mL)的 LB 培养基[同 5 步骤(7)], 并将其分装于 1.5mL 离

心管中，每离心管 1mL。

(2)待培养基凝固后，用灭菌牙签挑取相应克隆子，垂直插入离心管 2/3 处，并确保穿入菌量。

(3)将制备好的穿刺管置于 37°C 恒温培养箱，培养 16h。

(4)将上述经过 16h 恒温培养的穿刺管完成测序反应。

### 储存方式：

贮存于避光、干燥处，用后立即旋紧瓶盖；贮存期三年。

### 注意事项：

1.称量时注意粉尘，佩戴口罩操作以避免引起呼吸道系统不适。

2.干粉培养基使用后立即旋紧瓶盖，避免吸潮结块。贮存于避光、干燥处。未开封产品保质期三年。开封后根据存放条件的不同保质时间存在一定的差异。

### 废物处理：

检测之后带菌物品置于 121°C 下高压灭菌 30 分钟后处理。

## 附录：

# 微生物培养基正确配置方法及注意事项

### 步骤一：称量

根据配方和使用说明上所标注的重量，用 1/100 的电子天平准确称出所需的培养基（称量时可以使用称量纸）**注意：称量一定要准确**，称量不准，则会影响使用效果。

### 步骤二：溶解

#### 1.搅拌：

将培养基纳入烧杯容器中，加小适量的水，缓慢加水并用玻璃棒小幅度搅拌。

注意：一定要搅拌。特别是在溶解含有琼脂的培养基，在加热的同时一定要进行搅拌。

#### 2.加热：

倘若培养基中**不含琼脂**，一般**不需要对培养基进行加热**；相反**含有琼脂**，需要用本生灯

/电磁炉加热煮沸。

**注意：**

**(1) 琼脂只有煮沸，且不断搅拌才能溶解充分。**

不要把未经加热及搅拌煮沸的培养基溶液直接高压灭菌，这样很容易使琼脂溶解不充分，且粘在容器底部。

**(2) 不建议使用水浴加热或微波炉加热，特别是微波炉。**

水浴加热：一般需要时间长，也很可能会发生琼脂溶解不充分的情况。

微波炉加热：一般没法进行搅拌，也会容易使琼脂溶解不充分。

**(3) 琼脂溶解不充分导致非常严重的后果，会严重影响后续的铺平板、划线以及培养效果等，会导致实验无法完成。**

**3.待培养基完全溶解后，再加入适量的水搅拌均匀。如准备的培养基较多，在不锈钢锅中融化加热，是可以使用温水加热的，还需不停搅拌，防止焦化。**

如果不小心出现焦化现象，则表面制备好的培养基将无法使用，必须重新配制培养基。

**4.推荐使用玻璃、搪瓷材质的容器来溶解培养基。**

**注意：一定不要使用铜或铁容器来溶解制备培养基。**

因为铜或铁容器可能会导致容器内培养基中铜、铁超标，影响实验结果。

①其中培养基中铜含量大于 0.3 毫克每升，细菌不适宜生长。铁含量超过 0.14 毫克每升，会防止细菌产生毒素。

②实验中，容易发生反应和沉淀的药物应单独溶解，然后加入培养基中，如磷酸氢二钾和硫酸镁。

### **步骤三：调培养基 pH**

1.培养基中一般都已调好 pH 值，不需额外再次调节 pH 值。但如果是配制的培养基达不到实验的要求，则必须要进行调整。

(1) 如果有校准过的 **pH 计**，则可以使用 **pH 计**。如果没有，可以使用精确的 **pH 试纸**。

(2) 然后根据调节需要，使用 **1mol/L 氢氧化钠**或 **1mol/L 盐酸**进行微调，直到调节到配方所需要的 pH 值为止。

培养基有酸性或碱性，pH 值一般为 7.4 ~ 7.6。对于需要用氢氧化钠调节的培养基，需要将 pH 调至比要求值高 0.1 ~ 0.2 个单位，因为用氢氧化钠调节时，高压灭菌后培养基的 pH 值会降低 0.1 ~ 0.2。如果微生物培养基中含有碳酸钙，一般无需调整 pH 值。

#### **步骤四：培养基过滤**

1. 如果对配制的培养基没有特殊要求，这一步可以省略。
2. 培养基如有浑浊和沉淀现象，可将需要澄清的液体培养基进行油纸过滤。固体介质可以用双层纱布过滤，中间有一层薄薄的脱脂棉。

如果过滤法不能满足澄清要求，可以采用蛋清澄清法，即将培养基加热后冷却至五十度至六十度，不超过三角瓶一半的容量。每一千毫升放入 1~2 个蛋清，用力摇晃三至五分钟，用 121°C 高压蒸汽灭菌二十分钟，之后趁热取出过滤。

#### **步骤五：培养基分装**

1. 准备好的培养基根据用途不同，分为烧瓶、试管等容器。

①分装试管量大则采用-自动分液器。

②分装试管量小则采用-漏斗分液。

2. 分液量不超过容器体积的三分之二，三角瓶不要超过体积的二分之一，琼脂斜面不要超过试管长度的五分之一。

灭菌后斜面应为培养基量的三分之一，底层应为培养基量的三分之二，半固态琼脂的体积为三分之一。



用于接种或保护细菌的高级琼脂，分装试管长度的三分之一和四分之一，接种厌氧菌的量应达到三分之二；琼脂平板 90 毫米内径 13~15 毫升，内径 70 毫米 8~10 毫升。

3. 如果琼脂平板表面有较多水，可将平板倒置，置于 37°C 培养箱中三十分钟，晾干后使用。每批培养基分装在二十毫升左右的小玻璃瓶中，与该批培养基同时灭菌，在以确定这批培养基的最终 pH 值。

## 步骤六：培养基灭菌处理

分装完成的培养基应马上进行灭菌。其杀毒灭菌方式主要有三种类型：

### (1) 高压蒸汽灭菌方式

此方法可用于大多数耐热培养基。

①对于小份：121°C 十五分钟

②对于大份：121°C 三十分钟

③对于含糖类（碳水化合物）的培养基：则需要进行 113~115°C/15min 灭菌，以避免糖分的破坏，**避免焦化。**

### (2) 煮沸灭菌法方式

此方法可用于含有不耐高温物质的培养基。

### (3) 过滤除菌方式

此方法可用于当培养基中含有不耐热物质时。采用无菌技术来定量添加培养基。血液和抗生素可以用无菌技术抽取，并加入已经冷却至约五十度的培养基中。

对 LST 培养基进行灭菌时，发酵管内可能存在气泡。为了防止发酵管内形成气泡，可以采取以下措施：

(1) 倒置的小管内充满培养基，不留气泡，然后加入含有 LST 的试管中。

(2) 在关闭灭菌锅的排气阀之前，将锅内的气体排空。灭菌锅内空气是否排净，这个是影响灭菌是温度和压力比例关系的要点，同样达到了相同的压力的情况下，如果空气未能排净，也就是说不是纯蒸汽灭菌，此时的温度不一定能达到目的要求，会严重影响灭菌效果。

(3) 试管塞不要塞得太紧。使用硅胶塞时，请勿使用橡胶塞。

(4) 不可过早打开灭菌锅，等灭菌锅内的气压和温度降到与室温相同或相差不大时，再打开灭菌锅。如果按照以上方法操作还有气泡，可以用水作为培养基组的对照试验。如果培养基组依旧有气泡，对照组没有气泡，可以确定是培养基本身原因。

## 步骤七：培养基倒入平板

1. 将灭菌溶化的培养基冷却至五十度后，倒入无菌干燥的培养皿中。

微生物培养基制备的温度不能太高，否则培养皿内盖容易形成过多的冷凝水；温度太低，培养基容易凝固成块状，不能做成平板。

2.倒平板时，要靠近酒精的火焰（以此防止外来细菌落入盘中）。左手托住培养皿，右手托住三角瓶底部。用小指和手掌拉出锥形瓶的棉塞，烧灼烧瓶口，用拇指和食指在培养皿盖上打开一条缝，直到烧瓶口刚好伸进去，倒入培养基，直到底部被覆盖。

3.不要超过培养皿高度的三分之一，迅速盖上盖子，放在桌上后轻轻旋转培养皿，使培养基分布均匀，凝结后即可。24 小时后检查，如培养基未长杂菌，即可用来培养微生物。

## 步骤八：培养基摆斜面

灭菌完成后，将试管中的琼脂培养基放在木架或玻璃架上，并且要有适当的坡度。冷却后使琼脂凝固并变成斜面。（斜面长度不超过试管的二分之一）

## 步骤九：微生物培养基质检

1. 检验培养基灭菌后，若发现有破损，浸水，颜色异常，棉塞被培养基污染。所有这些问题，都必须丢弃，不能重复使用，并确定其最终 pH 值。

2. 无菌检查和效果检查也是必需的。

(1) 无菌检查是取 1~2 瓶无菌培养基，37°C 孵育一两天，确认无细菌生长。

(2) 效果检查是将标准菌株接种到相关培养基上进行细菌检查。菌种的生长、形态和生化条件与已知条件一致。

若两个条件都检查合格，准备好的培养基就可以使用了。