

Attachment 2

FAQ

1. 问：基因交付产品包括哪些内容？

答：金斯瑞基因合成的标准交付物是4ug冻干质粒。如果有穿刺或甘油菌发货需求，需要支付额外的制备费用。标准的4ug小抽质粒不建议直接用于细胞转染或者真核细胞蛋白表达。如果您的项目有转染或其它需求，您可以选择金斯瑞其它级别的质粒抽提服务，例如：研究级别，工业级别等。

2. 问：基因交付产品（质粒、甘油菌或穿刺菌）该如何保存？

答：通常建议保存温度：

冻干状态质粒	-20℃
甘油菌	-80℃
穿刺菌	4℃

如果是基因文库产品：

液体状态质粒或PCR产物	-20℃
甘油菌	-80℃

特别说明的是：穿刺菌即便在4℃条件下保存，保存周期也仅两周左右，故请尽快使用，或者制备甘油菌在-80℃长期保存。

3. 问：基因交付产品中会有哪些菌株？这些菌株的使用注意事项有哪些？

答：一般是Top10菌株，少数情况下是Stb13/EPI400/EPI300菌株，具体以甘油菌或穿刺菌标签上打印的菌株名称为准。菌株使用注意事项说明如下：

Top10：丰富培养基加抗性过夜摇菌即可；

Stb13：30℃摇菌，摇菌时间延长到20~24 h；

EPI400/EPI300，操作则较为特殊：

- 4 ml LB培养基，接入菌种（或10~50 μl菌液），加入相应抗生素；
- 将a中的培养物在37℃条件下，摇菌过夜；
- 取b中过夜培养的菌液按1:10的体积比转接到新鲜的培养基中，然后加入相应抗生素；
- 按1:1000的体积比加入诱导剂（induction solution），混合均匀后，37℃摇菌4h；
- 将d中得到的菌液，按照您的抽提试剂盒说明提取DNA。

4. 问：基因交付产品（质粒）使用时应注意哪些事项？

答：一般小抽质粒不能直接用于转染细胞和蛋白表达，需要转化后重新摇菌，用符合要求的试剂盒抽提出转染级别的质粒，同时您也可以选择我们公司的转染级别的质粒制备服务。

我司发货的小抽质粒，标准是不少于4 μg，冻干发货。由于质粒量少，开盖时容易丢失，故请在开盖前先进行离心操作，确保质粒沉在管子底部。打开盖子后，溶解时建议加入40 μl左右的TE buffer或ddH₂O溶解，充分混匀，然后再次通过离心将液体收集在管子底部，就可以进行后续的转化实验了。液体质粒参照标签上的质粒浓度进行稀释或浓缩即可，在进行后续实验前也建议通过离心将液体收集在管底。

冻干或者液体质粒都建议在-20℃保存，保存浓度您可根据实际需要安排，但是建议尽可能高浓度保存。

请注意电泳染料GelRed可能会对DNA迁移速率有一定的影响。

5. 问：基因交付产品（甘油菌和穿刺菌）使用时应注意哪些事项？

答：甘油菌/穿刺菌使用，建议在使用前进行复苏处理，可以先用接种针挑取穿刺菌丝或蘸取甘油

Attachment 2

FAQ

菌，在带有对应抗性的平板上划线，也可以用甘油菌直接涂布复苏，第二天再挑取生长正常的菌落接菌扩大培养，可以提高摇菌的效率和成功率。一般不建议使用穿刺菌或者甘油菌直接大批量接种培养。

其他注意要点：穿刺菌和甘油菌开盖后极易污染，使用过程请注意无菌操作，避免交叉污染；其次是保存条件和摇菌条件。可参照上述答题2及3的说明。质粒和甘油菌尽量不要反复冻融，穿刺菌保存尽量不要超过2周。

6. 问：拿到质粒冻干粉后，如何进行转化？

答：质粒转化操作具体流程如下：

- 取1支含有50 μ L~200 μ L 的TOP10感受态细胞（储存于-80℃）在冰上解冻20-30分钟；
- 取2~3 μ L（将冻干的4ug质粒用无菌水溶解成100ng / μ L，详可参照上述答题4的说明）溶解后转入解冻后的感受态细胞里（用手指轻轻弹拨）；
- 冰上放置10-15分钟；
- 将其2/3放置在42℃的水浴锅中，水浴120秒，进行热激；
- 立即从水浴锅中取出，放回冰上2~5分钟；
- 加入800 μ L LB培养基，并在37℃振荡培养箱（200rpm）中生长40分钟；
- 将部分或全部转化到含有100 μ g / ml 抗生素的LB琼脂平板上；
- 平板倒置，37℃过夜培养。

7. 问：对收到的质粒产品进行酶切验证时，对其的建议是什么？

答：a) 一般可以选择插入序列两头或者中间的酶切位点，可以单酶切也可以双酶切，建议选用的酶预计可以切出两个条带比较合适，只有一个条带或者条带太多都不利于酶切结果的判断。另外，注意切出的两条带的大小相差以大于0.5 kb，且不超过3 kb为宜。条带大小相近，则电泳时不容易分开；而条带大小相差太远，在电泳图上小条带会相对不明显。

b) 我司默认酶切条件：取约100-1000ng质粒产品，选择适宜的条件（一般酶切孵育温度为37℃）酶切30-60min，于1%琼脂糖凝胶中不超过250V（一般电泳电压为220V）电泳约12min检测。其他常见最适酶切温度非37℃的限制性内切酶及其推荐的酶切温度如下：

限制性内切酶	推荐酶切温度 (°C)
Apal	25
SmaI	25
BspQI	50
BsaI	65
SfiI	50
BsiwI	55
BstBI	65
BstEII	37
BsmBI	55

如果您对产品报告中的酶切验证有特殊要求，可以在下单前说明，以便我们评估可行性，同时也让您更放心。

8. 问：选择使用的酶无法顺利切开质粒，是什么原因导致？

答：首先确定酶切位点是否甲基化，甲基化一般常见有Dam（GmATC），Dcm[®]（C[®]WGG，W=A或T）和CpG（[®]CG），在酶切位点选择时尽量避免如：XbaI（TCTAGA），ClaI（ATCGAT），BclI（TGATCA），ApaI（GGGCCC），AvaII（GGWCC），SfiI（GGCCNNNNNGGCC），StuI（AGGCCT）等位点切割；无法避免这类酶切位点的，需将质粒转化甲基化缺陷型的细胞再抽提制备质粒，常用的Dam⁻/Dcm⁻细胞如：GM2163（E4105S），

ER2925，JM110等；当然，若是您有需要，在您下单时，可以标明或要求我们做去甲基化的处理。

其次是酶切buffer体系是否合适，酶有无失活等。

Attachment 2

FAQ

9. 问：为什么会在酶切位点两端有多余的碱基？这些多余的碱基是否影响使用？

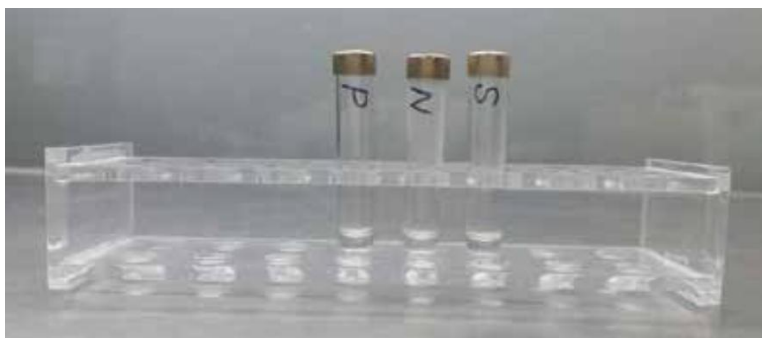
答：两端多余的保护碱基的存在是为了更有效的保证下一步酶切克隆的进行，一般不会对您的实验造成影响；若是有特殊的需求，下单时可以告知我们，我们会为您提供一个满意的实验解决方案。

10. 问：gRNA质粒在转化实验中优先选择哪个菌株？

答：我们优先推荐Stbl3菌株。

11. 问：内毒素（TAL/LAL）测试是如何进行的？

答：内毒素测试是一种凝胶实验，用于确定测试样品是否含有特定量的内毒素。将样品和鲎变形细胞裂解物（TAL/LAL）试剂溶液在无内毒素试管中混合，并在 37° C 下孵育 60 分钟（见图 A）。孵育后，倾斜试管以查看混合物是否凝结。如果样品中的内毒素比标准品少，则溶液保持液态；如果内毒素量高于标准，混合物会在管底凝结（见图 B）。

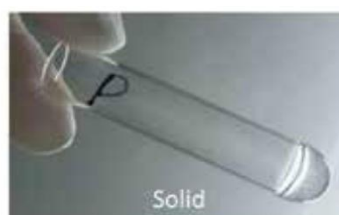
A. 37° C 孵育 60 分钟**B. 内毒素检测**

0分钟

60分钟

阳性对照
(内毒素标准品)

Liquid



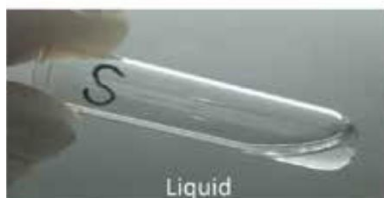
Solid

阴性对照
(内毒素检查用水)

Liquid



Liquid

样品
(内毒素检测管)

Liquid



Liquid

Attachment 2

FAQ

12. 问：如果对交付结果（实物交付、数据报告）有疑问，该如何反馈给金斯瑞？

答：如果您对我们的交付结果（实物交付、数据报告）有疑问，您可将您订购的基因订单号、质粒酶切图谱、测序结果以及具体问题发至我司基因技术支持邮箱：gene@genscript.com.cn，收到后我们会第一时间回复您。

13. 问：* EPI300-like1 (GenUltra1)/GenetoxicV&GenP&GenS&GenITR&Genpoly系列等感受态制备的质粒如何使用？

答：*EPI300-like1 (GenUltra1)/GenetoxicV&GenP&GenS&GenITR&Genpoly系列等感受态, 为自研保密菌。是由金斯瑞独家开发和拥有的专利。当有毒/不稳定基因使克隆变得困难时，使用如上相关感受态，金斯瑞不会将该菌株（包括但不限于感受态细胞、穿刺和甘油）作为商品分发给客户。如果您需要额外的质粒制备，请联系您的金斯瑞代表。

14. 问：水溶质粒A260/280在1.7-1.8是否表示质粒不纯？是否会影响后续使用？

答：研究表明，对于同一个质粒，溶剂pH和离子强度均会导致A260/280比值发生变化。当使用酸性溶剂时，A260/280低于真实值0.2-0.3，而当使用碱性溶剂时，A260/280高于真实值0.2-0.3。金斯瑞所使用的ddH₂O和Nuclease-free water 的pH为5.5-6.5，TE的pH为7.5左右。水溶质粒OD值读数稍低（1.7-1.8）为溶剂效应所致而非质粒不纯，不影响后续转化、酶切或测序等应用。若下游实验对EDTA敏感，可使用1mM Tris-HCl (pH 8.0) 作为溶剂，避免pH干扰对质粒质量的判断。如果您仍有任何疑问，请随时联系我们，我们将及时协助重新检测或提供更多数据。