

Getico 藻类冷冻保存试剂盒使用说明书

一、产品描述

保存和长期储存藻类的最佳方法是冷冻保存，它能显著减少遗传漂变，降低与维护大量藻类平板相关的劳动力和成本，也便于实验室之间的菌株和克隆交换。与大多数需要液氮储存的冷冻保存方法不同，GeneArt® 藻类冷冻保存试剂盒允许将藻类冷冻并储存在 -80°C 的冰箱中至少 2 年。GeneArt® 藻类冷冻保存试剂盒为莱茵衣藻和普通小球藻提供了优化的试剂和可靠的冷冻保存方案。

产品	目录号	数量	储存
藻类冷冻保存试剂盒包含：	131801	1 套	2°C 至 8°C
冷冻保存试剂 A		5 mL	
冷冻保存试剂 B		25 mL	

二、产品用途

仅供研究使用。不可用于诊断程序。

三、安全信息

阅读安全数据表（SDS）并遵循处理说明。穿戴适当的防护眼镜、衣物和手套。

四、操作流程

4.1 冷冻莱茵衣藻细胞

4.1.1 在标准培养条件下，将莱茵衣藻细胞（野生型或转化体）培养至对数生长中期至后期。

- 莱茵衣藻的培养条件：
 - 培养基：TAP 培养基

4.1.2 在 250 mL 透明玻璃培养瓶中，通过向 45mL 新鲜的 TAP 培养基中添加 1 mL 冷冻保存试剂 A 来制备预处理培养基。

- 培养类型：常规实验通常在室温下并在 1.5% 琼脂上进行，而单个实验的生长通常在摇瓶或培养瓶中的液体培养中进行。

4.1.3 用步骤 1 中的莱茵衣藻细胞接种预处理培养基，使最终 OD₇₅₀ 为 0.1（通常为 2 - 5 mL 种子培养物），OD₇₅₀ 不要超过 0.4。

- 温度范围：莱茵衣藻的最佳生长温度为 26° C，但莱茵衣藻实验室和野生型菌株在 20° C 至 28° C 的范围内生长良好，并且可以耐受低至 15° C 和高至 35° C 的温度。

4.1.4 将培养瓶放在设置为 110 rpm 的旋转摇床上，在藻类培养箱中于 26° C 和 50 μE m² s⁻¹ 下培养 3 天。您可以让细胞在预处理培养基中生长 2 - 5 天，但最佳时间是 3 天。

- 培养条件：光养培养，且需要 5% CO₂ 以实现最佳生长状态，并在连续光照下使用冷荧光白光的中等光强（50 μE m² s⁻¹）进行培养，并在设置为 100 - 150rpm 的旋转摇床上持续震荡培养。然而，莱茵衣藻 137c 菌株可以在不需要额外 CO₂ 供应的培养箱中生长。确保培养容器中实现适当的气体交换。转化和铺板后，不要堆叠培养板以允许连续均匀的光照。

4.1.5 生长 3 天后，测量培养物的 OD₇₅₀，并使用以下公式计算细胞浓度。细胞浓度（cells/mL）
= (OD₇₅₀ - 0.088) / (9 × 10⁸)

可选：在光照条件下生长 3 天后，培养物可以在收获前转移到弱光条件下培养过夜。此可选步骤可以提高冷冻期间的细胞活力。

- 推荐设备：培养莱茵衣藻的最佳设备是藻类培养箱，带有可调节的光源和光度计（例如，LI-COR® 的 LI-250A 光度计）以指导调整。如果没有藻类培养箱，细胞可以在标准细胞培养箱中培养，用放置在培养板 12 英寸内的冷荧光灯照明。标准室内灯光提供次优的生长条件。

4.1.6 通过离心收获细胞，2500rpm 离心 5 分钟，并小心地尽可能多地去除上清液。

4.1.7 将细胞重悬于冷冻保存试剂 B 中，终浓度为 2.5 × 10⁷ cells/mL。从此时开始计算孵育时间（室温下 30-45 分钟）。注意：不要超过 5 × 10⁷ cells/mL（浓度过高会导致细胞活力显著降低）。

4.1.8 向每个冷冻管中精确分装 240 μL 细胞悬液，并在室温下孵育 30-45 分钟。

4.1.9 将装有冷冻管的冷冻容器移至 -80° C。将冷冻容器放在冰箱中的开放空间，以确保没有其他物体阻碍冷却过程。

4.1.10 在接下来的 2 小时内，确保 -80° C 冰箱保持未打开状态。在此期间打开冰箱门会改变细胞的冷却曲线，并可能导致细胞活力下降。

4.1.11 冷冻 4 小时后，冷冻管可以转移到另一个容器中在 -80° C 下长期储存。

4.1.12 细胞可以在 -80° C 下储存至少 2 年。注意，此冷冻方案可能也适用于其他衣藻物种。

4.2 解冻莱茵衣藻细胞

- 4.2.1 从 -80°C 储存中取出冷冻细胞，并立即将其放入干冰容器中。将含有细胞的管理在干冰中，以尽量减少解冻前的温度波动。
- 4.2.2 向 500mL 玻璃培养瓶中加入 200mL 预热至室温的 TAP 培养基。
- 4.2.3 从干冰储存中取出含有冷冻细胞的冷冻管，并立即将其放入 35°C 水浴中。
- 4.2.4 通过在 35°C 水浴中轻轻旋转试管，快速解冻细胞，直到细胞完全解冻（1-2 分钟）。
- 4.2.5 打开前，用 70%乙醇擦拭试管外部。
- 4.2.6 将 $230\ \mu\text{L}$ 解冻的细胞从试管转移到含有 200mLTAP 培养基的玻璃培养瓶中。
- 4.2.7 将培养瓶置于设置为 26°C 和 $50\ \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的藻类培养箱中。
- 4.2.8 在旋转摇床上以 110rpm 的转速培养细胞 3-6 天。
- 4.2.9 在第 3 天，计算细胞数量。如果培养物尚未达到 1×10^6 cells/mL，将其返回藻类培养箱并继续培养。每天检查培养物的细胞浓度，直到达到 1×10^6 cells/mL。一旦培养物达到 1×10^6 cells/mL，就可以进行后续转化步骤。

4.3 冷冻普通小球藻细胞

- 4.3.1 在标准培养条件下，在 100mL TAP 培养基中将普通小球藻细胞（野生型或转化体）培养至对数生长中期至后期。
- 4.3.2 使用自动细胞计数器或您首选的方法确定细胞浓度和总细胞数。
- 4.3.3 通过离心收获细胞，2500rpm 离心 5 分钟，并小心地尽可能多地去除上清液。
- 4.3.4 将细胞重悬于冷冻保存试剂 B 中，终浓度为 1×10^8 cells/mL。从此时开始计算孵育时间（室温下 30 - 45 分钟）。注意：最终细胞浓度可以在 1×10^8 至 2×10^8 cells/mL 的范围内变化，而不会影响冷冻细胞的活力。
- 4.3.5 向每个冷冻管中精确分装 $240\ \mu\text{L}$ 细胞悬液，并在室温下孵育 30-45 分钟。
- 4.3.6 将冷冻管移至 -80°C 。并放在冰箱中的开放空间，以确保没有其他物体阻碍冷却过程。
- 4.3.7 在接下来的 2 小时内，确保 -80°C 冰箱保持未打开状态。在此期间打开冰箱门会改变细胞的冷却曲线，并可能导致细胞活力下降。
- 4.3.8 冷冻 4 小时后，冷冻管可以转移到另一个容器中在 -80°C 下长期储存。
- 4.3.9 细胞可以在 -80°C 下储存至少 2 年。注意，此冷冻方案可能也适用于其他小球藻物种。
- 4.3.10 遵循为衣藻细胞提供的解冻方案来复苏冷冻的小球藻管。