



DH5 α - 感受态细胞

产品信息:

组成	BC116-01	BC116-02
DH5 α - Competent cells	10 \times 100 μ l	20 \times 100 μ l
pUC19 (0.1ng/ μ l)	5 μ l	5 μ l

储存条件: -70 $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融。

产品介绍:

DH5 α -菌株是实验室最常用的感受态细胞。缺失核酸内切酶(endA1), 提高了质粒 DNA 的产量和质量; 重组酶缺陷型(recA1)减少插入片段的同源重组概率, 保证了插入 DNA 的稳定性; 由于 lacZ Δ M15 的存在以及 lacI q 基因的缺失, 故不需要加 IPTG, 只需要添加 X-gal 就可进行基于 α 互补原理上的蓝白斑筛选实验。感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒检测转化效率大于 10 8 cfu/ μ g。

基因型:

F- ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA -argF)U169 deoR, recA1endA1hsdR17 (rK $^+$, mK $^+$) phoAsupE44 λ thi -1gyrA96 relA1

产品特点:

缺失核酸内切酶(endA1), 提高了质粒 DNA 的产量和质量; 重组酶缺陷型(recA1)减少插入片段的同源重组概率, 保证了插入 DNA 的稳定性; 由于 lacZ Δ M15 的存在以及 lacI q 基因的缺失, 故不需要加 IPTG, 只需要添加 X-gal 就可进行基于 α 互补原理上的蓝白斑筛选实验。

操作步骤 (以下操作均按无菌条件的标准进行):

提示

- ◆ 感受态细胞应保存在-70 $^{\circ}$ C, 不可多次冻融和放置时间过长, 以避免降低感受态细胞的转化效率。
 - ◆ 进行转化操作时, 应根据相应温度及无菌条件的要求进行。
 - ◆ 为防止转化实验不成功, 可以保留部分连接反应液, 以重新转化, 将损失降到最低。
1. 取感受态细胞置于冰浴中, 如需分装可将刚融化细胞悬液分装到无菌预冷的离心管中, 置于冰浴中。
(一次转化感受态细胞的建议用量为 50-100 μ l, 可以根据实际情况分装使用。应注意所用 DNA 体积不要超过感受态细胞悬液体积的十分之一。) 以下实验以 100 μ l 感受态细胞为例。
 2. 向感受态细胞悬液中加入目的 DNA, 轻轻旋转离心管以混匀内容物, 在冰浴中静置 30 分钟。
 3. 将离心管置于 42 $^{\circ}$ C 水浴中放置 60 秒, 然后快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却 2 分钟, 该过程不要摇动离心管。(此步骤也可将离心管置于室温进行, 时间不需十分准确, 夏季或室温较高时, 可放置 5-8 分钟左右; 如果室温较低, 可延长时至 8-15 分钟左右。条件允许建议使用 42 $^{\circ}$ C 热激方法。)
 4. 向每个离心管中加入 500 μ l 无菌的 SOC 或 LB 培养基 (不含抗生素), 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C, 150rpm, 摇床振荡培养 60 分钟, 目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达, 使菌体复苏。
 5. 无菌条件下, 取适量菌液加到含相应抗生素的 LB 固体培养基平板上, 用无菌的细菌涂布器或玻璃珠将细胞均匀涂开。等平板中的液体完全吸收后, 倒置平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12-16 小时。(涂布用量可根据

具体实验来调整。转化质粒在 10ng 左右，90mm 平皿涂布 100 μ l，55mm 平皿涂布 50 μ l；连接产物的转化菌液建议离心后倒掉大部分上清，余 200 μ l，取 100 μ l 用于涂布。）

6. 保留剩余的菌液于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中，视平板上菌落生长情况决定去留。

（**质粒快速转化步骤**：将步骤 2 的时间缩短到 5 分钟，对于氨苄青霉素抗性的质粒，步骤 3 完成后，可直接涂布或划线于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上。其它抗性的质粒仍需 60 分钟的复苏培养。）

相关试剂及培养基的制备方法：

1. LB 液体培养基：称取 10g Tryptone，5g Yeast Extract 和 10g NaCl 置于 1L 烧杯中。加入约 800ml 的去离子水，完全溶解后用 2mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0。加去离子水定容至 1L。分装后，121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 分钟。
2. SOB 和 SOC 培养基：称取 20g Tryptone，5g Yeast Extract，0.5g NaCl 置于 1L 烧杯中加入约 800ml 的去离子水，完全溶解后再补加 10ml 250mM KCl 溶液，滴加 5M NaOH（约 0.2ml）调 pH 至 7.0。加入去离子水将培养基定容至 1L。121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 分钟。使用时加入 5ml 灭菌的 2M MgCl₂ 溶液（此种培养基称为 SOB）。再补加经 0.22 μ m 过滤除菌的 1M 葡萄糖溶液 2ml（此种培养基为 SOC）。
3. 转化复苏细菌用的液体 LB 培养基或 SOC 培养基：可以一次高压 50ml 液体培养基，无菌状态按 1ml 每管分装于高压灭菌的 1.5ml 离心管中，装于自封袋中，冻存于 -20 $^{\circ}$ C 中，每次用一支。可以极大地避免培养基污染和减少劳动量。
4. LB 固体选择培养基：100ml LB 液体培养基中加入 1.5g 琼脂粉，摇匀后，121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 分钟。冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右时加入相应浓度的抗生素（如 AMP 浓度通常为 100 μ g/ml），混匀后倒在细菌用的无菌培养皿中，等琼脂凝固后即可使用。
5. IPTG：称量 1.9g IPTG（MW=238.31）充分溶解于 40 ml 灭菌水，浓度为 200mmol/L。用无菌 0.22 μ m 过滤膜过滤除菌。小份分装后，-20 $^{\circ}$ C 保存。
6. X-gal：用 DMF（二甲基甲酰胺）配制成 20mg/ml，小份分装（1ml/份）后，-20 $^{\circ}$ C 避光保存。