



OrigamiB(DE3) 感受态细胞

产品信息：

组成	BC205-01	BC205-02
OrigamiB(DE3) Competent	10×100μl	20×100μl
cells pUC19 (0.1ng/μl)	5μl	5μl

储存条件：-70℃保存，避免反复冻融。

产品介绍：

本公司生产的 OrigamiB(DE3)感受态细胞是采用大肠杆菌 OrigamiB(DE3)菌株经特殊工艺处理得到的感受态细胞，可用于 DNA 的化学转化。使用 pUC19 质粒检测，转化效率可达 10^7 cfu/μg，-70℃保存几个月转化效率不发生改变。每支感受态可以酌情分装使用，降低了实验的成本。质量稳定，使用方便，质优价廉。

基因型：*F-ompThsdSB(r_B-m_B)-galcdmlacY1ahpC(DE3)gor522::Tn10trxB(Kan^R, Tet^R)*

抗生素耐药性：细胞具有卡那霉素和四环素抗性。

产品特点：

1. 适宜 Amp 抗性质粒。
2. OrigamiB(DE3)菌株包含突变的硫氧还蛋白还原酶 thioredoxin reductase(trxB)和谷胱甘肽还原酶 glutathione reductase(gor)基因，表达主要还原途径的两个关键酶。有利于形成正确折叠的含有二硫键的蛋白，增强蛋白的可溶性。

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℃，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 50-100μl，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 100μl 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℃水浴中放置 60 秒钟，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，可延长至 8-15 分钟左右。条件允许建议使用 42℃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。

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 40ml 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。

BM190318