TOP10 感受态细胞说明书

产品组成

TOP10 感受态细胞 Cat.No.	10 支 8302010	20 支 8302020
TOP10 感受态细胞 Control DNA（pUC19，0.1 ng/μl） 说明书	100 μl×10 支 10 μl×1 支 1 份	100 μl×20 支 20 μl×1 支 1 份

产品储存与有效期

1. 感受态细胞必须用干冰运输，熔化后的感受态细胞不能再冻结储存。如果用户收到感受态细胞后发现泡沫箱中的干冰已经挥发殆尽，应予以拒收。
2. 收到感受态细胞后应立即储存在－70℃以下的冰箱中，在 6 个月内使用不影响转化效率；感受态细胞不可反复冻融，不要与经常使用的分子生物学试剂放在一起，避免因温度的波动而影响效率。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：E-mail:technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

产品介绍

本公司生产的 TOP10 感受态细胞是采用大肠杆菌 TOP10 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。经 pUC19 质粒检测，转化效率可达 10^8 cfu/μg。每支感受态可以酌情分装使用，以降低实验的成本。

TOP10 菌株介绍

基因型： F-，mcrAΔ(mrr-hsd RMS-mcrBC)，φ80，lacZΔM15，ΔlacX74，recA1，araΔ139Δ(ara-leu)7697，galU/galK，rps，(Str^R) endA1，nupG。

特点：本菌株是一种常用于质粒克隆的菌株。适用于高效的 DNA 克隆和质粒扩增，能保证高拷贝质粒的稳定遗传。其φ80、lacZΔM15 基因的产物可与 pUC 载体编码的β-半乳糖苷酶氨基端实现α-互补，可用于蓝白斑筛选。

质量标准

1. 使用 1 ng pUC19 Plasmid 转化 100 μl TOP10 感受态细胞测试，产生的菌落数＞1×10^8 transformants/1 μg pUC19 Plasmid 。
2. β-半乳糖苷酶、α-互补性的确认：TOP10 感受态细胞使用 pUC19 Plasmid 转化后，在含有 100 μg/ml 的 Ampicillin、40 μg/ml 的 X-Gal 的 L-琼脂平板培养基上培养，产生蓝色菌落。
3. 100 μl 的 TOP10 感受态细胞在含有 100 μg/ml Ampicillin 的 L-琼脂平板培养基上培养 40 小时不产生菌落。

用户需自备的试剂与物品

1. 试剂：LB 液体与固体培养基、抗生素。
2. 物品：弯头玻棒铺菌器、碎冰、水浴锅、超净工作台、摇床、移液器与无菌吸头、无菌 1.5 ml 离心管、台式小量离心机（可配 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）。
3. 筛选蓝白斑需要试剂：X-Gal、IPTG。

使用前准备

1. 感受态细胞从－70℃以下冰箱取出后立即置于冰上熔化，将水浴锅温度设置为 42℃或将相应抗生素平板温育至 37℃。
2. 相应抗生素溶液、24 mg/ml 的 IPTG 溶液及 20 mg/ml 的 X-Gal 溶液。注意 20 mg/ml 的 X-Gal 溶液要避光保存。

常规操作步骤

1. **从－70°C以下冰箱中取出感受态细胞置于冰上熔化，若需分装可将刚熔化的细胞悬液分装到无菌预冷的离心管中，再置于冰浴中。**

* 一次转化感受态细胞的建议用量为 50-100 μl，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 μl 感受态细胞为例。

2. **向感受态细胞悬液中加入目的 DNA（1-10 ng，且体积<10 μl），盖上管盖，轻轻旋转离心管以混合内容物，冰浴 30 分钟。**

* 转化效率与外源 DNA 的浓度在一定范围内成正比，但当加入的外源 DNA 量过多或体积过大时反而会降低转化效率。转化时 DNA 体积要小于感受态细胞体积的十分之一。

3. **将离心管置于 42°C水浴 90 秒，然后迅速将离心管转移到冰上静置 3 分钟。**

* 注意该过程不要摇动离心管。

4. **向离心管中加入 900 μl 无菌 LB 培养基（不含抗生素），盖上管盖，颠倒混匀后置于 37°C摇床振荡培养 1 小时（160-220 转/分钟）。**

* 该步骤的目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。

5. **5000 rpm 离心 4 分钟后弃掉部分上清，保留 100-150 μl 培养基，用移液器轻轻吹打悬浮菌体后，全部加到含相应抗生素的 LB 固体培养基上或含 X-Gal、IPTG 及相应抗生素的 LB 固体培养基上，用无菌弯头玻棒铺菌器将细胞均匀涂开。**

* 如果预计的单克隆数量较多，可省略离心步骤，直接取 200-300 μl 转化产物涂布平板（过多的菌液涂布可能会使单克隆菌落粘连在一起，难以挑取）。涂布后剩余的菌液可置于 4°C保存，如果次日的转化菌落数过少可以将剩下的菌液再涂布至新的平板上。

6. **将平板置于室温直至液体被吸收，倒置平板，37°C培养 12-16 小时可出现单菌落或蓝白斑。**

简易操作步骤

此步骤不适用某些抗生素抗性的质粒（比如卡那霉素抗性），若出现转化异常，请按常规操作步骤操作。

1. **将选择性固体培养基放于培养箱中预热至 37°C。**
2. **从－70°C以下冰箱中取出感受态细胞置于冰上熔化，若需分装可将刚熔化的细胞悬液分装到无菌预冷的离心管中，再置于冰浴中。**
3. **向感受态细胞悬液中加入目的 DNA（1-10 ng，且体积小于感受态细胞体积的十分之一），盖上管盖，轻轻旋转离心管以混合内容物，冰浴 3-5 分钟。**

* 转化效率与外源 DNA 的浓度在一定范围内成正比，但当加入的外源 DNA 量过多或体积过大时反而会降低转化效率。

4. **将已转化的感受态细胞全部加到预热至 37°C的含相应抗生素的 LB 固体培养基上或含 X-Gal、IPTG 及相应抗生素的 LB 固体培养基上，用无菌弯头玻棒铺菌器将细胞均匀涂开。**
5. **将平板置于室温直至液体被吸收，倒置平板，37°C培养 12-16 小时可出现单菌落或蓝白斑。**