

TOP10 感受态细胞说明书

产品组成

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

产品储存

1. 感受态细胞必须用干冰运输，融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 $^{\circ}$ C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，不要与限制性内切酶等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的效率。

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 DNA 的化学转化。经 pUC19 质粒检测，转化效率可达 10⁸cfu/ μ g。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。

TOP10 菌株介绍

基因型： F⁻，mcrA Δ (mrr-hsd RMS-mcrBC)， ϕ 80，lacZ Δ M15， Δ lac X 74，recA1，ara Δ 139 Δ (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 ϕ 80、lacZ Δ M15 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 质粒 DNA 转化 100 μ l Competent Cells DH5 α 测试，产生的菌落数 >1 \times 10⁸ transformants/1 μ g pUC19 Plasmid。

2. β -半乳糖苷酶、 α -互补性的确认：对 E.coli Competent Cells TOP10 使用 pUC19 DNA 进行转化后，在含有 100 μ g/ml 的 Ampicillin、40 μ g/ml 的 X-Gal 的 L-琼脂平板培养基上，产生蓝色菌落。

3. 100 μ l 的 E.coli Competent Cells TOP10 在含有 100 μ g/ml Ampicillin 的 L-琼脂平板培养基上过夜培养 40 hr 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、移液器与无菌枪头、无菌 1.5ml 离心管、台式少量离心机（可配 1.5ml 离心管和 2ml 离心管的转子）。
3. 筛选蓝白斑所需：X-gal、IPTG。

使用前准备

1. 感受态细胞从-80 $^{\circ}$ C取出立即置于冰上冻融，将水浴锅温度设置为 42 $^{\circ}$ C或将相应抗生素平板温育至 37 $^{\circ}$ C。

2. 相应抗生素溶液、24mg/ml 的 IPTG 溶液及 20mg/ml 的 X-gal 溶液。注意 20mg/ml 的 X-gal 溶液要避光保存。

常规操作步骤

1. 从-70℃冰箱中取出感受态细胞置于冰上融化，如需分装可将刚融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)，轻轻旋转离心管以混匀内容物，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℃水浴中 90 秒，迅速将管转移到冰上 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），混匀后置于 37℃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. 将已转化的感受态细胞低速离心（5000 rpm, 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 固体琼脂培养基上，或含 X-gal、IPTG 及相应抗生素的 LB 琼脂平板表面，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℃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℃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，请用常规步骤操作。

1. 将选择性固体培养基放于培养箱中预热至 37℃。

2. 从-70℃冰箱中取出感受态细胞置于冰上融化，如需分装可将刚融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<10 μl)，轻轻旋转离心管以混匀内容物，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。转化时 DNA 体积要小于感受态细胞体积的十分之一。

4. 取已转化的感受态细胞直接涂布到预热至 37℃含相应抗生素的 LB 固体琼脂培养基上，或含 X-gal、IPTG 及相应抗生素的 LB 琼脂平板表面，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℃培养 12-16 小时可出现单菌落或蓝白斑。