

M5 HiPer DB10B Competent Cell (DB10 感受态细胞) 使用说明书

| 产品名称 | 单位 | 货号 |
|-------------------------------|---------------------------|----------|
| M5 HiPer DB10B Competent Cell | 100 μ l \times 10 支 | MF832-10 |
| M5 HiPer DB10B Competent Cell | 100 μ l \times 20 支 | MF832-20 |

【储存条件】

-70 $^{\circ}$ C 恒温保存，避免反复冻融，有效期六个月；干冰运输。

【产品简介】

DH10B 感受态细胞是采用大肠杆菌 DH10B 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 108cfu/ μ g，-70 $^{\circ}$ C 保存几个月转化效率不发生改变。

基因型：*F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74recA1endA1araD139 Δ (ara,leu)7697galE15galK λ -rpsLnupG*

【产品特点】

1. 可高效转化大小为 150Kb 质粒，用于产生 cDNA 或基因组文库。
2. 用于蓝、白斑筛选。

【使用方法】

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。

按照无菌操作规程进行下列操作步骤：

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 $^{\circ}$ 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。

【注意事项】

1. 融化后的感受态细胞应及时进行转化，以免降低转化效率；融化后不宜再次冻结保存。
2. 整个操作过程要轻柔，避免移液枪吹吸。

3. 请使用传热性能好的薄壁试管或离心管，换用不同的试管或离心管时，应摸索热激时间，以获得最佳转化效率。
4. 请保留剩余的连接反应液，以便在转化实验不成功时重新进行转化。
5. 经验表明，使用 SOC 培养基复苏比使用 LB 培养基复苏的转化效率高约一倍以上。

【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°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°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 0.22μm 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°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°C 高压灭菌 20 分钟。冷却至 50°C 左右时加入相应浓度的抗生素 (如 AMP 浓度通常为 100μg/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 μm 过滤膜过滤除菌。小份分装后，-20°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°C 避光保存。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。