

TOP10(*araBAD*C⁻) Chemically Competent Cell

产品说明书

● 产品规格 (CAT#: EC2090)

TOP10(<i>araBAD</i> C ⁻) Competent Cell	100μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (6个月)

● 基因型

F⁻ *mcrA*Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80 *lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R)
endA1 *nupG*

● 产品说明

TOP10(*araBAD*C⁻)为原核表达专用菌株, 此菌株的阿拉伯糖操纵子被破坏, 可用于阿拉伯糖诱导的原核表达, 多用于 pBAD/His A, B, and C, pBAD/Myc-His A, B, and C 等质粒的原核表达。*recA1* 和 *endA1* 的突变有利于插入 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。可用于构建质粒、扩提质粒、蓝白斑筛选、原核蛋白表达等实验。

TOP10(*araBAD*C⁻)感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 >1 × 10⁸ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. TOP10(*araBAD*C⁻)感受态细胞从-80°C拿出, 迅速插入冰中, 5分钟后待菌块融化, 加入目的 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨打 EP 管底轻轻混匀(避免用枪吸打), 冰中静置 25 分钟。
2. 42°C水浴热激 45 秒, 迅速放回冰上并静置 2 分钟, 晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 700 μl 不含抗生素的无菌培养基 (2YT 或 LB), 混匀后 37°C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心 1 分钟收菌, 留取 100 μl 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 2YT 或 LB 培养基上。
5. 将平板倒置放于 37°C培养箱过夜培养。如果进行蓝白斑筛选操作, 将平板放 37°C培养至少 13 h。

● 蛋白小量诱导表达 Protocol (for reference only)

1. 小摇接菌：在透气试管或透气离心管中准备 1-3ml 含相应抗生素的液体 LB（或 2YT、SOB、TB（唯地 CAT#：CM1018L）等营养丰富培养基），接入一个含有目的质粒的新鲜单菌落。以质粒 pBAD/HisA 为例：在 TB 营养液中过夜培养的菌体浓度约为 LB 的 3-5 倍，SOB 的 2-3 倍。
2. 37°C，200 rpm 过夜摇菌约 10-15h。
3. 大摇接菌：将第一步的小摇菌液按 1-2% 比例接菌到 50ml 含相应抗生素的 LB（或 2YT、SOB、TB 等营养丰富培养基），为增加溶氧，最好使用 500ml 三角瓶（加入营养液的体积一般为三角瓶标定体积的 1/10，最高不超过 1/5）。
4. 37°C，150-200 rpm 摇菌到 OD600 值为 0.5-0.6（一般需要 2-3h）。
5. 空白对照取样（可选步骤）：在加入诱导剂前可取样 1ml 菌液到 1.5ml 离心管中，12000rpm 离心 10 分钟，弃上清，沉淀放 -20°C 保存待用。
6. 第四步的三角瓶中加入 L-阿拉伯糖至终浓度为 2%、0.2%、0.02%、0.002%（L-阿拉伯糖浓度可自由调整，可以 10 倍为稀释梯度，做梯度试验），继续 37°C，150-200 rpm 摇菌 4h。
7. 不同时间点取样（可选步骤）：最佳摇菌时间与所表达蛋白有关，表达蛋白不同最佳摇菌时间不同，为找到最佳诱导时间可在不同诱导时间点取样（例：在诱导第 2h，3h，4h，5h 取样，离心后放 -20°C 保存）。
8. 离心收菌：三角瓶从摇床拿出，埋入冰中 10 分钟，4°C，5000g，10 分钟离心，弃上清，沉淀保存在 -20°C。
9. 待所有样品准备妥当，可以做 SDS-PAGE 分析蛋白表达。

● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰中缓慢融化，插入冰中 8 分钟内加入目标 DNA，不可在冰中放置时间过长，长时间存放会降低转化效率。
2. 混入质粒时应轻柔操作，转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
3. 诱导时，L-阿拉伯糖浓度可自由调整，可以 10 倍为稀释梯度，做梯度试验。为获得需要量的蛋白，最佳诱导时间，温度，诱导剂浓度需实验者优化。
4. TOP10_(araBAD⁻)也可用于扩繁质粒，若要获得大量，高纯度质粒，建议在 TB 培养基（唯地 CAT#：CM1018L） 中摇菌培养（以标准质粒 PUC19 为例：在 TB 营养液中过夜培养的菌体浓度和质粒产量为 LB 的 3-4 倍，SOC 的 2 倍）