

Top10-T1R Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE1012)

Top10-T1R Electroporation-Competent Cell	50μl /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*) λ-φ80 *lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R)
endA1 nupG tonA

● 产品说明

Top10-T1R 电击感受态细胞只能用于电击转化, 不能用于热激转化。Top10-T1R 兼顾 Top10 和 DH10B 菌株的优点, 来源于 Top10 菌株, 在 Top10 基因组中引入 *tonA* 突变, 赋予其对 T1/T5 噬菌体的抗性, 同时缺失核酸内切酶 (*endA*), 提高了质粒 DNA 的产量和质量; 重组酶缺陷型 (*recA*) 减少插入片段的同源重组概率, 保证了插入 DNA 的稳定性; *lacZ*Δ*M15* 的存在使 Top10-T1R 可用于蓝、白斑筛选; 此外在 Top10-T1R 基因组中 *mrr*、*hsdRMS*、*mcrA*、*mcrBC* 几个基因位点被突变, 从外源摄入的甲基化 DNA 不被降解, 有利于甲基化 DNA 的克隆和扩繁; 来源于真核基因组的 DNA 在 Top10-T1R 细胞中可以稳定存在, 广泛用于真核基因组文库的构建和扩繁。Top10-T1R 电转感受态转化效率极高, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 >4 × 10¹⁰ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. 取适量 SOC 放 37 度预热 1-2 小时 (每管感受态准备 10ml SOC)。
2. 0.1 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟沥干水分, 正置 5 分钟, 待乙醇挥发干净立即插入冰中, 压实冰面, 电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取 -80°C 保存的 Top10-T1R 电击感受态细胞插入冰中 5 分钟, 待其融化, 加入目的 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨动 EP 管底轻轻混匀, 避免产生气泡, 立即插入冰中。
 - A. 测定转化效率使用 1 μl 10 pg/μl 的对照质粒 pUC19;
 - B. 对于连接产物, 部分公司的 T4 连接酶体系或重组体系可与电击感受态混合后电击转化, 无需进行 DNA 纯化, 但 DNA 浓度不能过高, DNA 浓度不超过 100 ng/μl, 体积不超过 5 μl/50 μl 感受态。
 - C. 对离子浓度较高的 DNA 溶液或反应体系请用膜纯化或乙醇沉淀法纯化 DNA, ddH₂O 溶解后电击转化。
4. 用 200 μl 枪头 (用刀切除 0.5cm 枪尖) 将感受态-DNA 混合物快速移到电击杯中 (避免产生气泡), 轻轻晃动使液面保持水平状态, 盖上杯盖, 插入冰中。
5. 启动电转仪, 设置参数: C=25 μF, PC=200 Ω, V=1.8 kV, 将电击杯从冰中拿出, 用吸水纸擦拭表面, 吸干表面水渍, 放入电转槽中, 电击完成后拿出电转杯放室温, 打开杯盖, 15 秒内加入 0.9ml 预热的 SOC (此步骤可在电转仪旁操作, 无需在超净台操作), 用 1ml 枪吹吸电击杯底部 2-3 次, 混匀后转移到 50 ml 离心管 (BD Falcon 50 ml 离心管等), 向离心管中补加 S.O.C. 培养基至 10 ml。37°C, 225 rpm 复苏 60 分钟。

- 5000 rpm 离心一分钟收菌，重悬后取 100-200 μ l 涂布到含相应抗生素的 S.O.C 平板上（因菌量较大，若全部涂板请选用直径 15cm 培养皿 2-5 个）。将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养 15-24 小时。
- 若要获得大量，高纯度质粒，建议在 TB 培养基（唯地 CAT#: CM1018L）中 37 度摇菌培养（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 2-3 倍）

● 培养基配方：

S.O.C 培养基（唯地 CAT#: CM1014L）PH 7.0	TB 培养基（唯地 CAT#: CM1018L）PH 7.2
2% Tryptone	1.2% Tryptone
0.5% Yeast Extract	2.4% Yeast Extract
10 mM NaCl	0.4% 甘油
2.5 mM KCl	0.231% KH ₂ PO ₄
10 mM MgCl ₂	1.254% K ₂ HPO ₄
10 mM MgSO ₄	TB 培养基中添加 0.017M 磷酸二氢钾和 0.072M 磷酸氢二钾成分，在大肠杆菌进入稳定后期可以稳定培养基 pH 值，提高菌体密度。
20 mM glucose	
S.O.C. is suitable for use in the final step of cell transformation to obtain maximal transformation efficiency (Hanahan, 1983).	

● 注意事项

- 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。
- 电击感受态细胞加入电击杯应避免产生气泡，气泡会增加弧光放电风险。
- 当 DNA 不纯或存在盐，乙醇，蛋白及缓冲液等污染时，转化效率急剧下降。
- 电击杯里的离子可增加溶液的电导，增大在含有细胞和 DNA 的溶液中产生电流和弧光放电的风险。
- 若转化大质粒或想获得较高转化效率，推荐使用高纯质粒提取试剂盒提取质粒。质粒增大一倍，转化效率下降一个数量级。
- 对于连接产物，最好用膜纯化或乙醇沉淀法纯化 DNA 后用适量 ddH₂O 或 TE 缓冲液（10 mM Tris HCl, pH7.5; 1 mM EDTA）重悬产物，保证 DNA 浓度不超过 100 ng/ μ l。过高浓度连接产物或过大体积连接产物会降低转化效率，增加弧光放电的风险。
- 混入质粒时应轻柔操作，吸取感受态细胞时避免用力过猛，以免剪切力过大损伤细胞膜，降低转化效率。转化高浓度的质粒或连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。
- 电击感受态细胞最好保存在 -80°C 以下，高于 -80°C 超期储存会导致转化效率会下降。