

### DH5 $\alpha$ -EM Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: DL1009)

DH5 $\alpha$ -EM Competent Cell	100 $\mu$ l /支
pUC19 (control vector, 10pg/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
保存条件 (保质期):	-80 $^{\circ}$ C (6个月)

#### ● 基因型

F-  $\phi$ 80 *lac*  $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-arg F*) U169 *endA1 recA1 hsdR17(r<sub>K</sub>,m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1 phoA*

#### ● 产品说明

DH5  $\alpha$ -EM 菌株是以 DH5  $\alpha$  为底盘菌, 经过定向筛选得到的红霉素敏感株系, 适合做红霉素抗性质粒扩繁试验的特殊菌株, 广泛用于具有红霉素抗性筛选标记的质粒扩繁试验。DH5  $\alpha$ -EM 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;*lac* $\Delta$ M15 的存在使 DH5  $\alpha$ -EM 可用于蓝、白斑筛选。DH5  $\alpha$ -EM 化学感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp<sup>R</sup>) 检测转化效率>0.1 $\times$ 10<sup>9</sup> cfu/ $\mu$ g DNA。

#### ● 操作方法

1. DH5  $\alpha$ -EM 感受态细胞从-80 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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  $\mu$ l 不含抗生素的无菌培养基 (2YT 或 LB), 混匀后 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心 1 分钟收集菌体, 留取 100  $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C培养箱过夜培养。如果进行蓝白斑筛选操作, 将平板放 37 $^{\circ}$ C培养至少 15 h。
6. 在转化红霉素抗性质粒前要确定两点: 1, 是否是穿梭质粒, 如果是穿梭质粒, 要确定质粒是否有两个抗性筛选标记, 如果有红霉素抗性基因的同时还有氨苄或卡那等抗性基因, 通常使用氨苄或卡那霉素这类常用抗生素进行质粒扩繁, 不优先使用红霉素。2, 如果质粒只有一个红霉素抗性基因, 可尝试用红霉素 (唯地货号: YC9081) 进行质粒扩繁, 优先使用 LB 培养基 (唯地货号: CM1010), 固体平板中红霉素的工作浓度一般为 200ug/ml, 液体培养时红霉素浓度一般用 100ug/ml。因红霉素抗性基因的启动子不同, 部分质粒需要在 100-400ug/ml 范围内做梯度试验确定最佳红霉素使用浓度。

● 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。混入目的 DNA 时应轻柔操作。
2. 含有红霉素的平板务必避光保存；提前 30 分钟拿出，打开盖子放超净台将平板表面吹干，降低平板含水量。
3. 转化高浓度的质粒或高效率的连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。

2nd Lab<sup>®</sup>  
For a Better Lab