Code No. 9139

研究用

TaKaRa

Competent Cell Preparation Kit

说明书

v201702Da

目　　录

内　容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保　　存	1
● 使用注意	1
● 感受态细胞的制备方法	1
● 感受态细胞的 DNA 转化	2
● 实验例	2
● 相关试剂及培养基的制备方法	3
■ Ampicillin	3
■ IPTG	3
■ X-Gal	3
■ LB 培养基	3
■ LB/Amp 培养基	3
■ SOB 培养基	3
■ SOC 培养基	4
■ φb×broth	4
■ LB/Amp/X-Gal/IPTG 平板培养基	4

● 制品说明

大肠杆菌经过处理后可以摄取外源DNA（Plasmid DNA、Phage DNA等），处于这种状态的细胞称为感受态细胞（Competent Cell）。在基因工程实验中，经常要使用各种感受态细胞进行DNA的转化操作。

实验使用的感受态细胞的来源大体可以分为两种：一种是购买商品化的感受态细胞，但商品化感受态细胞成本高、运输及保存有一定困难（超低温）；另一种是自己制备感受态细胞，实验人员自己制作感受态细胞时，往往受到各种试剂及实验条件等限制，制备的感受态细胞效率低，达不到实验要求。

Competent Cell Preparation Kit是一种方便、高效、快速制备感受态细胞的试剂盒。使用本试剂盒制备的感受态细胞可以满足大多数实验的需要，并且适用于几乎所有常用的大肠杆菌，例如：*E.coli* DH5α、JM109、CJ236、HB101、MV1184、BMH*71-18mut*S等，转化效率均可以达到1×10^6 cfu/μg pUC19以上（转化效率根据大肠杆菌细胞系及转化用DNA不同稍有差异）。使用本试剂盒制备的感受态细胞可以在-80℃保存一年。

● 制品内容（200 次量）

Solution A	20	ml
Solution B	20	ml

● 保　存：　4℃

● 使用注意：

1. 制作感受态细胞时应使用专用的玻璃器皿或塑料容器。洗刷这些玻璃器皿或塑料容器时应尽量洗净。由于微量的洗涤剂或污染物都可能降低感受态细胞的转化效率，因此在洗刷完用于制作感受态细胞的专用玻璃器皿或塑料容器后，建议用去离子水浸泡一晚，然后再充分洗净。
2. 制作感受态细胞时使用的菌种，不应使用 4℃或常温保存的传代细菌。应使用-70℃保存的菌种，在LB/抗生素平板培养基上分级划线培养后，挑取单菌落。使用这种菌种制作的感受态细胞，能提高转化效率。
3. 培养感受态细胞制备用菌体时，OD_{600} 值的测定应随时进行，以使 OD_{600} 值控制在 0.35～0.5 之间。如果 OD_{600} 值超出此范围，可能降低感受态细胞的转化效率。
4. 用于感受态细胞制备的菌体培养停止后要立即处理，不要将培养液过长时间室温放置，在冰中放置时也不要时间过长。
5. 感受态细胞的制备操作过程中，离心后弃上清时要尽量弃尽，否则会降低感受态细胞的转化效率。
6. 使用 Solution A、Solution B 悬浮沉淀时要用手指轻轻弹动 Microtube 管壁，禁止剧烈振荡操作。
7. 为了有效确认感受态细胞的转化效率，建议制作一批高纯度的质粒 DNA 分装低温（-20℃）保存，用作阳性对照，以确认每批制作的感受态细胞的转化效率。

● 感受态细胞的制备方法

1. 菌种纯化。
   ① 使用 LB/抗生素平板培养基（根据菌种性质加入适当的抗生素），用接种针挑取大肠杆菌（-70℃甘油保存菌），在平板培养基上分级划线，以能够出现单菌落为宜。
   ② 将上述划线的平板培养基倒置于恒温培养箱中 37℃过夜培养。

2. 菌体培养。

① 取 20 ml φb×broth 移至 100 ml 三角烧瓶中，塞上棉塞后高温高压灭菌，然后冷却至室温。

② 在划线平板培养基上挑取单菌落，接种到①的培养基中。

③ 37℃振荡（约 120 rpm）培养。

④ 测定 OD_{600} 值，当 OD_{600} 值达到 0.35～0.5 时（约培养 5 小时）放置冰中停止培养（如果 OD_{600} 值超出此范围将不能保证感受态细胞的转化效率）。

⑤ 进行下一步操作。

3. 感受态细胞的制备

① 取上述菌体培养液 1 ml 于 1.5 ml Microtube 中（根据需要量确定 Microtube 数量）。

② 1,500×g（一般的微型离心机约 4,000 rpm）4℃离心 5 分钟，弃上清（注意尽量除尽上清）。

③ 在每个 Microtube 中加入 100 μl 冰中预冷的 Solution A，轻轻弹动 Microtube 使沉淀悬浮，禁止剧烈振荡。

④ 1,500×g（一般的微型离心机约 4,000 rpm）4℃离心 5 分钟，弃上清（注意尽量除尽上清）。

⑤ 在每个 Microtube 中加入 100 μl 冰中预冷的 Solution B，轻轻弹动 Microtube 使沉淀悬浮，禁止剧烈振荡。

⑥ 感受态细胞制作完成。本感受态细胞可以直接用于 DNA 的转化实验，也可以于−80℃中保存，以备以后使用。在−80℃保存时，可以有效保存一年以上，但不能反复冻融，一旦融解后，不能再进行−80℃保存。

● 感受态细胞的 DNA 转化

1. 将−80℃保存的感受态细胞置于冰中融化 10 分钟。
2. 取 100 μl 的感受态细胞移至新的转化管中。
3. 向感受态细胞中加入 0.1 ng～10 ng（3 μl～10 μl）的转化用 DNA，轻轻混匀后冰中放置 30 分钟。
4. 42℃水浴中放置 45 秒钟后，立即于冰中放置 1～2 分钟。
5. 加入 890 μl 37℃预温的 SOC 培养基。
6. 37℃振荡培养 1 小时。
7. 取适量涂平板后，将平板倒置于 37℃培养箱中培养一夜。
8. 确认培养菌落，进行下步实验。

● 实验例

使用本试剂盒按标准操作方法制备了 *E.coli* K802 感受态细胞，使用 pUC19 质粒 1 ng 转化至 *E.coli* K802 感受态细胞中，在含有 Amp 抗性的 L−琼脂平板培养基上形成单菌落，计算菌落数及转化效率，结果见下表。

表. *E.coli* K802 感受态细胞的转化效率

Sample	涂板量（μl）	菌落数	转化效率（cfu/μg pUC19）
A	50	298	5.96×10^6
	100	640	6.40×10^6
B	50	242	4.84×10^6
	100	621	6.21×10^6
平均转化效率			5.58×10^6

● 相关试剂及培养基的制备方法

■Ampicillin

1. 组份浓度: 100 mg/ml
2. 配 制 量: 50 ml
3. 配制方法:

① 称量 5 g Ampicillin 置于 50 ml 离心管中。
② 加入 40 ml 灭菌水，充分混合溶解后，定容至 50 ml。
③ 用 0.22 μm 过滤膜过滤除菌。
④ 小份分装（1 ml/份）后，−20℃保存。

■IPTG

1. 组份浓度: 24 mg/ml
2. 配 制 量: 50 ml
3. 配制方法:

① 称量 1.2 g IPTG 置于 50 ml 离心管中。
② 加入 40 ml 灭菌水，充分混合溶解后，定容至 50 ml。
③ 用 0.22 μm 过滤膜过滤除菌。
④ 小份分装（1 ml/份）后，−20℃保存。

■X−Gal

1. 组份浓度: 20 mg/ml
2. 配 制 量: 50 ml
3. 配制方法:

① 称量 1 g X−Gal 置于 50 ml 离心管中。
② 加入 40 ml DMF（二甲基甲酰胺），充分混合溶解后，定容至 50 ml。
③ 小份分装（1 ml/份）后，−20℃避光保存。

■LB 培养基

1. 组份浓度:

1%（W/V）	Tryptone
0.5%（W/V）	Yeast Extract
1%（W/V）	NaCl

2. 配 制 量: 1 L
3. 配制方法:

① 称取下列试剂，置于 1 L 烧杯中。

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g

② 加入约 800 ml 的去离子水，充分搅拌溶解。
③ 滴加 5 N NaOH（约 0.2 ml），调节 pH 值至 7.0。
④ 加去离子水将培养基定容至 1 L。
⑤ 高温高压灭菌后，4℃保存。

■LB/Amp 培养基

1. 组份浓度:

1%（W/V）	Tryptone
0.5%（W/V）	Yeast Extract
1%（W/V）	NaCl
0.1 mg/ml	Ampicillin

2. 配 制 量: 1 L
3. 配制方法:

① 在 1 L LB 培养基中加入 1 ml Ampicillin（100 mg/ml）后均匀混合。
② 4℃保存。

■SOB 培养基

1. 组份浓度:

2%（W/V）	Tryptone
0.5%（W/V）	Yeast Extract
0.05%（W/V）	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	$MgCl_2$

2. 配 制 量: 1 L
3. 配制方法:

① 配制 250 mM KCl 溶解。
在 90 ml 的去离子水中溶解 1.86 g KCl 后，定容至 100 ml。
② 配制 2 M $MgCl_2$ 溶液。
在 90 ml 去离子水中溶解 19 g $MgCl_2$后，定容至 100 ml，高温高压灭菌。
③ 称取下列试剂，置于 1 L 烧杯中。

Tryptone	20 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	0.5 g

④ 加入约 800 ml 的去离子水，充分搅拌溶解。
⑤ 量取 10 ml 250 mM KCl 溶解，加入到烧杯中。
⑥ 滴加 5 N NaOH（约 0.2 ml），调节 pH 值至 7.0。
⑦ 加去离子水将培养基定容至 1 L。

⑧ 高温高压灭菌后，4℃保存。

⑨ 使用前加入 5 ml 灭菌的 2 M $MgCl_2$ 溶液。

■SOC 培养基

1. 组份浓度：

2%（W/V）	Tryptone
0.5%（W/V）	Yeast Extract
0.05%（W/V）	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	$MgCl_2$
20 mM	葡萄糖

2. 配 制 量： 100 ml

3. 配制方法：

① 配制 1 M 葡萄糖溶液。

称量 18 g 的葡萄糖溶于 90 ml 去离子水中，充分溶解后定容至 100 ml，用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

② 向 100 ml SOB 培养基中加入除菌的 1 M 葡萄糖溶液 2 ml，均匀混合。

③ 4℃保存。

■ φb×broth

1. 组份浓度：

2%（W/V）	Tryptone
0.5%（W/V）	Yeast Extract
0.5%（W/V）	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

2. 配 制 量： 1 L

3. 配制方法：

① 称取下列试剂，置于 1 L 烧杯中。

Tryptone	20 g
Yeast Extract	5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g

② 加入约 800 ml 的去离子水，充分搅拌溶解。

③ 滴加 1 N KOH，调节 pH 值至 7.5。

④ 加去离子水将培养基定容至 1 L。

⑤ 高温高压灭菌后，4℃保存。

■LB/Amp/X-Gal/IPTG 平板培养基

1. 组份浓度：

1%（W/V）	Tryptone
0.5%（W/V）	Yeast Extract
1%（W/V）	NaCl
0.1 mg/ml	Ampicillin
0.024 mg/ml	IPTG
0.04 mg/ml	X-Gal
1.5%（W/V）	Agar

2. 配 制 量： 1 L

3. 配制方法：

① 称取下列试剂，置于 1 L 烧杯中。

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g

② 加入约 800 ml 的去离子水，充分搅拌溶解。

③ 滴加 5 N NaOH（约 0.2 ml），调节 pH 值 7.0。

④ 加去离子水将培养基定容至 1 L 后，加入 15 g Agar。

⑤ 高温高压灭菌后，冷却至 60℃左右。

⑥ 加入 1 ml Ampicillin（100 mg/ml）、1 ml IPTG（24 mg/ml）、2 ml X-Gal（20 mg/ml）后均匀混合。

⑦ 铺制平板（30～35 ml 培养基/90 mm 培养皿）。

⑧ 4℃避光保存平板。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686
4006518761，4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: http://www.takara.com.cn

v201702Da