

TOP10 Electro

TOP10 Electroporation-Competent Cell

保存条件： -80℃

产品规格:

TOP10 Ele	5×50μl
pUC19 (control vector)	10pg/μl; 10μl

基 因 型

F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80 *lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *ara*Δ139Δ(*ara-leu*)7697 *galU*  
*galK**rpsL* (Str<sup>r</sup>)*endA1* *nupG*

简 要 说 明

TOP10 电击感受态细胞只能用于电击转化，不能用于热激转化。

TOP10 来源于 MC1061 菌株， 是目前实验室最常用的感受态细胞之一，基因型与 DH10B 高度类似 (DH10B 为 *galE15* 型，而 TOP10 为 *galU* 型)。 TOP10 生长速度快 (比 DH5 α 快，但比 Mach1-T1 生长速度慢)， 10 小时可见克隆。*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。可用于构建克隆，蓝白斑筛选等实验，具有链霉素抗性。

-TOP10 电击感受态细胞经特殊工艺制作，pUC19 质粒检测转化效率可达 1×10<sup>10</sup> cfu/ μg DNA。

操 作 说 明

- 一、0.1cm 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，待其沥干水分，正置 5 分钟，使乙醇充分挥发，待乙醇挥发干净立即插入冰中，压实冰面，电极杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖，冰中静置 5 分钟充分降温。
- 二、取-80℃保存的 TOP10 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) 并用手拨打 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，请用乙醇沉淀 DNA 后加入适量 TE 缓冲液 (10mM TrisHCl, pH7.5;1mM EDTA) 重悬，DNA 浓度不超过 100ng/  $\mu$ l，体积不超过 5  $\mu$ l/50  $\mu$ l 感受态。

三、用 200  $\mu$ l 枪头将感受态-DNA 混合物快速移到电击杯中，避免产生气泡，盖上杯盖。

四、启动电转仪，设置参数：C=25  $\mu$ F，PC=200  $\Omega$ ，V=1.8kV（此为 BioRad 电转仪推荐参数，也可按所用电转仪推荐的参数操作），将电击杯快速放入电转槽中，电击完成快速插入冰中。

五、2 分钟后从冰中取出电击杯，放室温，加入 700  $\mu$ l 不含抗生素的无菌 S.O.C. 培养基（室温），用 1ml 枪吹吸电击杯底部数次混匀后，转移到 50ml 离心管（BD Falcon50ml 锥形离心管等），向离心管中补加 S.O.C. 培养基至 5ml。37℃，225 rpm 复苏 60 分钟。

六、5000rpm 离心一分钟收菌，重悬后取 100-200  $\mu$ 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℃培养箱过夜培养 13-17 小时。

### 注 意 事 项

（一）加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。

（二）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。

（三）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。

（四）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。

（五）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。

（六）对于连接产物转化，最好转化前乙醇沉淀 DNA 后用适量 TE 缓冲液（10 mMTrisHCl,pH7.5;1 mMEDTA)重悬产物，保证 DNA 浓度不超过 100ng/  $\mu$ 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。

（七）混入质粒时应轻柔操作，吸取感受态细胞时不可用孔径过小的枪头（普通 200 $\mu$ l 枪头应剪去枪头尖 0.6cm)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。

（八）电击感受态细胞最好保存在-80℃以下，高于-80℃超期储存会导致转化效率会下降。