

Trelief® 5a Chemically Competent Cell

■ 目录号

TSC-C01

■ 基因型

F' ϕ 80(*lacZ*) Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rK, mK') *phoA supE44* λ *thi-1 gyrA96 relA1*

■ 产品简介

Trelief® 5a是转化效率大于 10^{10} cfu/ μ g的化学感受态细胞,采用大肠杆菌DH5a的突变株,结合本公司独创的超高效率感受态制备缓冲液及特殊的制备工艺,转化效率达到电转化感受态细胞同一级别,对>15 kb质粒的转化效率亦无明显降低,最高可转化50 kb大小的质粒。本产品对四环素不敏感,可转化除四环素外的大部分抗性质粒。本产品兼容Amp抗性质粒的10 min快速转化流程及Kana抗性质粒的30 min快速转化流程,可用于常规的克隆、蓝白斑筛选、珍贵核酸样品的转化、DNA/cDNA文库构建等实验。使用pUC19质粒DNA检测,转化效率高达 1.5×10^{10} cfu/ μ g。

■ 产品组成

组分	规格
Trelief® 5a Chemically Competent Cell	100 μ L \times 10支
pUC19 (Control Vector)	10 μ L (10 pg/ μ L)

■ 使用方法

1. 常规转化流程

- 1) 取100 μ L冰上融化的感受态细胞,加入目的DNA(质粒或连接产物),轻轻混匀(轻柔吹打或轻弹管壁数下),冰上静置30 min。
- 2) 42°C水浴热激45~60 s,迅速转移至冰浴中,静置2 min(冰上静置过程中请勿晃动样品,否则会降低转化效率)。
- 3) 向离心管中加入700 μ L不含抗生素的无菌液体培养基(SOB或LB),混匀后37°C,200 rpm复苏60 min。
- 4) 根据实验需要,取合适体积的复苏液均匀涂布到含相应抗生素的SOB或LB培养基上,将平板倒置放于37°C培养箱过夜培养。

2. 快速转化流程

A. Amp抗性质粒

- 1) 取100 μ L冰上融化的感受态细胞,加入目的DNA(质粒或连接产物),轻轻混匀(轻柔吹打或轻弹管壁数下),冰上静置5 min。
- 2) 42°C水浴热激45~60 s,迅速转移至冰浴中,静置2 min(冰上静置过程中请勿晃动样品,否则会降低转化效率)。
- 3) 向离心管中加入700 μ L不含抗生素的无菌液体培养基(SOB或LB),取合适体积的复苏液均匀涂布到含Amp抗生素培养基上,或不加培养基直接涂布,37°C培养箱倒置培养过夜。

B. Kana抗性质粒

- 1) 取100 μ L冰上融化的感受态细胞,加入目的DNA(质粒或连接产物),轻

轻混匀(轻柔吹打或轻弹管壁数下),冰上静置5 min。

- 2) 42°C水浴热激45~60 s,迅速转移至冰浴中,静置2 min(冰上静置过程中请勿晃动样品,否则会降低转化效率)。
- 3) 向离心管中加入700 μ L不含抗生素的无菌液体培养基(SOB或LB),混匀后37°C,200 rpm复苏20 min(复苏时间每增加5 min转化效率提高3~5倍)。
- 4) 取合适体积的复苏液均匀涂布到含Kana抗生素培养基上,37°C培养箱倒置培养过夜。

附:Kana抗性的质粒快速转化流程必须增加复苏这一步骤,这是由于Amp抗生素和Kana抗生素的作用机理不同。Amp抗生素阻止细菌细胞壁的合成以抑制细菌生长,但不影响Amp抗性基因的表达,抗性基因表达产物降解Amp抗生素后细菌正常生长扩张;Kana抗生素能与细菌30S核糖体结合从而使mRNA密码误读,Kana抗性基因无法表达,抗生素不被降解,细菌无法生长。因此Kana抗性质粒的转化必须增加复苏步骤,使细菌细胞内积累一定量的抗性基因表达产物。

■ 转化实例

1. 以转化质粒pUC19为例

A. 常规转化流程

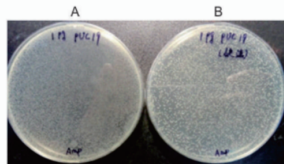
- 1) 取100 μ L冰上融化的Trelief® 5a感受态细胞,加入10 μ L pUC19 (1 pg/ μ L, Amp^r),轻轻吹打混匀,冰上静置30 min。
- 2) 42°C水浴热激45~60 s,迅速转移至冰浴中,静置2 min。
- 3) 向离心管中加入700 μ L无抗性LB培养液,37°C/200 rpm复苏60 min。
- 4) 吸取80 μ L复苏液(1 pg质粒当量)均匀涂布到含Amp抗性培养基上,37°C培养箱倒置培养过夜,结果如下(图1-A)。

B. 快速转化流程

- 1) 取100 μ L冰上融化的Trelief® 5a感受态细胞,加入10 μ L pUC19 (1 pg/ μ L, Amp^r),轻轻吹打混匀,冰上静置5 min。

2) 42°C水浴热激45~60 s,迅速转移至冰浴中,静置2 min;

- 3) 向离心管中加入700 μ L无抗性LB培养液,不复苏直接吸取80 μ L(1 pg质粒当量)均匀涂布到含Amp抗性培养基上,37°C培养箱倒置培养过夜,结果如下(图1-B)。



注:A(常规转化)转化子大于 1.5×10^{10} cfu/ μ g
B(快速转化)转化子大于 4×10^{10} cfu/ μ g

图1. 普通pUC19质粒的常规转化及快速转化

2. 以TA克隆为例

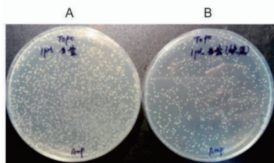
A. 常规转化流程

- 1) 取100 μ L冰上融化的Trelief® 5a感受态细胞,加入10 μ L pClone007克隆产物(pClone007 Blunt Vector(Amp, 1.9 kb)+Insert A(3 kb)),轻轻吹打混匀,冰上静置30 min。
- 2) 42°C水浴热激45~60 s,迅速转移至冰浴中,静置2 min。
- 3) 向离心管中加入700 μ L无抗性LB培养液,37°C/200 rpm复苏60 min。
- 4) 吸取80 μ L复苏液(1 μ L连接产物当量)均匀涂布到含Amp抗性培养基上,37°C培养箱倒置培养过夜,结果如下(图2-A)。

B. 快速转化流程

- 1) 取100 μ L冰上融化的Trelief® 5a感受态细胞,加入10 μ L pClone007克隆产物(pClone007 Blunt Vector (Amp, 1.9 kb)+Insert A(3 kb)),轻轻吹打混匀,冰上静置5 min。

- 42°C水浴热激45~60 s, 迅速转移至冰浴中, 静置2 min。
- 向离心管中加入700 μL无抗性LB培养液, 不复苏直接吸取80 μL (1 μL连接产物当量)涂板, 37°C培养箱倒置培养过夜, 结果如下(图2-B)。



注:A (常规转化)转化子大于2000 cfu/μL
B (快速转化)转化子大于1000 cfu/μL

图2. 普通连接克隆的常规转化及快速转化

3. 重组克隆转化 (以pET28a, pGADT7重组为例)

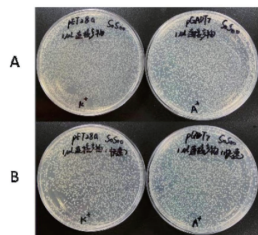
A. 常规转化流程

- 取两支100 μL冰上融化的Trelief® 5α感受态细胞, 分别加入10 μL Trelief® SoSoo重组克隆产物(pET28a(Kana, 5.3 kb)+Insert C(4 kb), pGADT7(Amp, 8 kb)+Insert B(4 kb)), 轻轻吹打混匀, 冰上静置30 min。
- 42°C水浴热激45~60 s, 迅速转移至冰浴中, 静置2 min。
- 向离心管中加入700 μL无抗性LB培养液, 37°C/200 rpm复苏60 min。
- 分别吸取80 μL复苏液(1 μL连接产物当量)均匀涂布到含相应抗性培养基上, 将平板倒置放于37°C培养箱过夜培养, 结果如下(图3-A)。

B. 快速转化流程

- 取两支100 μL冰上融化的Trelief® 5α感受态细胞, 分别加入10 μL Trelief® SoSoo重组克隆产物(pET28a(Kana, 5.3 kb)+Insert C(4 kb), pGADT7(Amp, 8 kb)+Insert B(4 kb)), 轻轻吹打混匀, 冰上静置5 min。
- 42°C水浴热激45~60 s, 迅速转移至冰浴中, 静置2 min。

- 向离心管中加入700 μL无抗性LB培养液, pET28a重组的质粒37°C/200 rpm复苏20 min, pGADT7重组质粒不复苏。
- 分别吸取80 μL复苏液(1 μL连接产物当量)均匀涂布到含相应抗性的培养基上, 37°C培养箱倒置培养过夜, 结果如下(图3-B)。



注:A (常规转化)pET28a转化子大于4000 cfu/μL,
PGADT7转化子为8000 cfu/μL
B (快速转化)pET28a转化子大于1500 cfu/μL,
PGADT7转化子为3000 cfu/μL

图3. 重组克隆的常规转化及快速转化

■ 注意事项

- 感受态细胞在冰上融化;
- 实验操作轻柔;
- 请勿反复冻融;
- 目的质粒或连接产物不能超过感受态总体积的1/10;
- 珍贵核酸样品的转化请务必使用常规转化流程。

■ 常见问题及解决方案

Q1. 转化后不长菌或菌落极少?

- 检查上游构建是否有问题: 查看样品浓度、连接比例、温度、时间是否合适, 建议做一个构建阳性对照。
- 检查感受态细胞是否失效: 设置一组质粒转化阳性对照验证感受态效率, 建议每次使用妥善冻存的感受态细胞, 感受态勿反复冻融。
- 平板是否有问题: 抗生素种类是否正确、添加是否过量, 建议重新配制平板。

Q2. 转化后平板上无单克隆, 出现类似白色浆状物菌膜?

- 抗生素无效或浓度过低, 操作中引入杂菌: 重新转化质粒, 更换抗生素。
- 涂布后, 平板未晾干。
- 转化时, 质粒添加过量。

Q3. 生长速度慢, 菌落小?

- 复苏时间过短: 延长复苏时间, 提高菌落在平板上的生长速度。
- 培养基或基因质量: 若生长时间超过18小时菌落仍然很小, 可能是培养基质量低下或者基因本身存在毒性抑制细菌生长, 建议更换高质量培养基。

Q4. 长杂菌或微卫星菌落?

- 抗生素失效或有效浓度下降: 配制平板时培养基温度过高、平板配制时间过长、抗生素母液配制时间过长、使用了劣质抗生素, 建议重新配制平板或更换高质量抗生素。
- 污染相同抗性菌落: 更换所用试剂、耗材, 无菌操作。推荐做转化实验之前, 使用攀科核酸清洁液(目录号:TSP001)喷洒实验台、实验仪器、用具, 消除污染。

■ 保存条件

-83~-78°C保存6个月。

■ 技术支持

公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系: product@tsingke.com.cn。

