



GeticoElectra DH10B T1 噬菌体抗性感受态细胞使用说明书

一、产品概述

GeticoElectra DH10B T1 噬菌体抗性感受态细胞，基于经典的 DH10B 菌株改造而来，通过引入 tonA 基因突变，赋予细胞对 T1 和 T5 噬菌体的高度抗性，有效避免噬菌体污染对珍贵实验样本及文库构建工作的破坏。同时，该感受态细胞具备一系列有利于基因克隆与质粒扩增的遗传特性，是分子生物学实验中进行高效转化、构建基因组文库与 cDNA 文库等工作的理想选择。

二、产品特性

- 1. 噬菌体抗性：**携带 tonA 突变，对 T1 和 T5 噬菌体具有显著抗性，极大降低实验过程中因噬菌体污染导致实验失败的风险，保障实验结果的可靠性与稳定性。
- 2. 高转化效率：**经过特殊工艺处理，其转化效率表现出色，对于超螺旋 DNA，转化效率可达 1×10^9 cfu/ μ g，适用于对转化效率要求严苛的实验，如构建高质量的基因组文库或 cDNA 文库。
- 3. 适合甲基化 DNA 克隆：**mcrA、mcrBC 及 mrr 等甲基化依赖的限制系统发生突变，能够高效转化富含甲基胞嘧啶或甲基腺嘌呤的 DNA，无论是真核生物还是原核生物的甲基化基因组 DNA，均可稳定导入细胞内，在相关基因克隆实验中发挥关键作用。
- 4. 低重组率：**recA1 基因突变使得细胞内克隆 DNA 的重组频率大幅降低，有效维持插入 DNA 片段的稳定性，确保所克隆基因的完整性，为后续基因功能研究等实验提供可靠保障。
- 5. 蓝白斑筛选适用性：**含有 $\phi 80lacZ\Delta M15$ 基因型，支持基于 α -互补原理的蓝白斑筛选实验。在含有 X-Gal 和 IPTG 的平板上培养转化后的细胞，可根据菌落颜色直观区分重组子与非重组子，便于快速筛选阳性克隆。
- 6. 稳定的质粒复制：**可实现高拷贝数质粒的稳定复制，有助于大量获取高质量的质粒 DNA，满足下游实验如酶切、测序、转染等对质粒量的需求。
- 7. 链霉素抗性：**rpsL 基因赋予细胞链霉素抗性，可在含有链霉素的培养基中进行筛选培养，有效排除杂菌干扰，确保转化细胞的纯度。

三、适用范围

- 1. 基因组文库构建：**凭借对甲基化 DNA 的高效转化能力以及稳定的遗传特性，能够将原核生物或真核生物的基因组 DNA 片段高效导入细胞内，构建涵盖物种完整基因信息的基因组文库，为基因资源挖掘、功能基因筛选等研究奠定基础。
- 2. cDNA 文库构建：**适用于以 mRNA 为模板反转录合成 cDNA 后，将 cDNA 片段克隆至载体并导入感受态细胞，构建 cDNA 文库，用于研究特定组织或细胞在特定生理状态下的基因表达情况，挖掘差异表达基因。
- 3. 位点特异性突变：**可用于携带位点特异性突变的质粒转化，通过蓝白斑筛选及后续验证实验，筛选出含有预期突变的克隆，助力基因功能与调控机制的深入研究。
- 4. 大质粒克隆与扩增：**能够稳定复制和扩增较大分子量的质粒，对于一些需要构建大质粒载体进行基因功能验证、基因编辑等实验具有重要应用价值。

四、产品组成



1. **GeticoElectra DH10B T1 噬菌体抗性感受态细胞**：若干支（规格如 100 μL / 支），储存于 -80°C ，为实验提供具有高效转化能力和噬菌体抗性的感受态细胞。
2. **对照质粒（如 pUC19 DNA, 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ ）**：1 支（50 μL ），用于检测感受态细胞的转化效率，验证实验操作的有效性。储存于 -20°C 。
3. **说明书**：1 份，包含产品详细信息、操作步骤、注意事项等关键内容，指导用户正确使用产品。

五、操作步骤

（一）电转化操作

1. 准备工作

- 从冰箱取出适量的 SOC 培养基， 37°C 预热 1 - 2 小时（每管感受态细胞准备 10 mL SOC 培养基）。
- 取 0.1 cm 电击杯和杯盖，从储存液中拿出后倒置于干净的吸水纸上 5 分钟，沥干水分；然后正置 5 分钟，待乙醇挥发干净后立即插入冰中，压实冰面，使电击杯顶部离冰面 0.5 cm 以便盖上杯盖，在冰中静置 5 分钟充分降温。

1. 感受态细胞与 DNA 混合

- 从 -80°C 冰箱取出 GeticoElectra DH10B T1 噬菌体抗性感受态细胞，插入冰中 5 分钟，待其融化。
- 向感受态细胞中加入目的 DNA（质粒或连接产物），用手指轻轻拨打 EP 管底部混匀，避免产生气泡，随后立即插入冰中。
- 注意：对于测定转化效率，使用 1 μL 浓度为 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 的对照质粒 pUC19；若为连接产物，需提前用乙醇沉淀 DNA，然后加入适量 TE 缓冲液（10 mM Tris - HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA）重悬，确保 DNA 浓度不超过 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，体积不超过感受态细胞体积的 1/10（如 5 μL /50 μL 感受态细胞）。

1. 转移至电击杯

- 用切除 0.5 cm 枪尖的 200 μL 枪头，将感受态 - DNA 混合物快速移至电击杯中，避免产生气泡。轻轻晃动电击杯，使液面保持水平状态，盖上杯盖，再次插入冰中。

1. 电击转化

- 启动电转仪，设置合适参数。以 Bio - Rad 电转仪为例，推荐参数为 $C = 25 \mu\text{F}$, $PC = 200\Omega$, $V = 1.8 \text{ kV}$ ；若使用其他品牌电转仪，请按照仪器推荐参数设置。
- 从冰中取出电击杯，用吸水纸迅速擦拭表面，吸干水渍后放入电转槽中。电击完成后，立即将电击杯取出放于室温。

1. 复苏培养

- 电击完成后 15 秒内，打开电击杯盖，加入 100 μL 预热的 SOC 培养基（可在电转仪旁操作，无需在超净台）。
- 用 1 mL 枪吹吸电击杯底部 2 - 3 次，使细胞与培养基充分混匀，然后将混合液转移至 50 mL 离心管中。
- 向离心管中补加 SOC 培养基至 10 mL，置于 37°C 摇床，220 rpm 复苏培养 60 分钟。

1. 涂板培养

- 将复苏后的菌液 5000 rpm 离心 1 分钟收集细胞，根据实验需求留取 100 - 200 μL 菌液重悬，涂布到含相应抗生素的平板上。
- 若转化高浓度的质粒或连接产物，可适当减少涂板菌量。将平板倒置放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱，过夜培养 12 - 16 小时，待菌落长出。

(二) 化学转化操作（化学感受态效率相对较低，仅供参考，一般优先推荐电转化）

1. 感受态细胞解冻

- 从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出感受态细胞，放置在冰浴或冰水浴中融化，约 5 - 10 分钟。注意不要放置时间过长，以免影响转化效率。

1. DNA 样品加入

- 每 100 μL 感受态细胞中加入待转化 DNA 样品（如质粒、连接产物或重组产物等）约 10 μL 。加入后，用手指轻轻弹击管底 2 - 3 次，使 DNA 与感受态细胞充分接触，然后立即冰上静置孵育。
- 注意：加入待转化 DNA 样品体积不宜超过感受态细胞体积的 10%；加入 DNA 后应轻柔操作，避免使用移液枪吹打混匀。若用于质粒的转化扩增，冰浴静置约 10 分钟后可直接涂板培养过夜；若用于连接产物或重组产物的转化，建议冰浴静置 30 分钟，并严格执行后续热激及复苏步骤，以提高转化效率。

1. 热激处理

- 将冰浴后的离心管快速置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中，静置热激 90 秒，期间不要晃动离心管。
- 热激结束后，迅速将离心管转移至冰水浴中，静置 2 - 3 分钟，使细胞快速冷却。

1. 复苏培养

- 向离心管中加入 900 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 LB 或 SOC 培养基，颠倒数次混匀，然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床，约 220 rpm 复苏培养 45 分钟。

1. 收菌涂板

- 若用于质粒的转化扩增，可直接取 50 - 100 μL 菌液进行涂板；若用于连接产物或重组产物的转化，建议先将菌液 5000 g，室温离心 1 分钟沉淀细菌，吸除约 900 - 950 μL 上清，用剩余的约 50 - 100 μL 菌液重悬细胞后，涂布到含相应抗生素的 LB 平板上。

1. 过夜培养

- 将涂好菌液的平板在超净台中稍微晾至无明显水渍，有利于形成单克隆。然后将平板倒置放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱，过夜培养。

六、注意事项

- 1. 储存条件：**感受态细胞应储存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ ，严禁置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 或液氮中保存。反复冻融或储存温度不当会导致细胞活性下降，显著降低转化效率。
- 2. 操作温度：**整个操作过程除热激步骤外，均需在低温环境下进行，尽量保持感受态细胞处于冰浴状态，减少温度变化对细胞活性的影响。
- 3. DNA 质量与用量：**确保待转化的 DNA 纯度高，无盐、乙醇、蛋白及缓冲液等污染，否则会急剧降低转化效率。对于连接产物，最好进行膜纯化或乙醇沉淀纯化，并控制重悬后的 DNA 浓度不超过 100 ng/ μL 。同时，加入 DNA 的体积不应大于感受态细胞体积的 1/10。



4. **操作手法：**加入 DNA 后，避免用移液器吹吸感受态细胞，仅用手指轻弹混匀即可，防止对细胞造成机械损伤，影响转化效果。在吸取感受态细胞时，动作要轻柔，避免用力过猛。若使用电转化，将感受态 - DNA 混合物转移至电击杯时，要避免产生气泡，气泡会增加弧光放电风险，降低转化效率。
5. **电击杯处理：**使用电击杯前，务必确保其充分沥干水分且乙醇挥发干净，否则残留液体可能影响电击效果，导致转化失败。电击杯使用后，应及时清洗并妥善保存，避免损坏。
6. **涂板与培养：**涂板时，确保菌液均匀分布在平板上；培养前将平板晾至合适状态，避免菌液堆积影响菌落生长与单克隆形成。培养过程中，按照推荐温度和时间进行培养，若培养温度过高或时间过长，可能导致菌落生长异常或出现杂菌污染。
7. **废弃物处理：**实验过程中产生的废弃菌液、培养基及一次性耗材等，应按照生物安全相关规定进行妥善处理，防止生物污染。