

PIR1 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DL3100)

PIR1 Competent Cell	100μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件:	-80°C

● 基因型

F- Δ lac169 rpoS(Am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA(Δ MluI)::pir-116

● 产品说明

PIR1 菌株是 Invitrogen 公司开发的大肠杆菌菌株, 专门用于含 R6K γ 复制子的质粒的克隆与扩繁, 核心元件是 pir-116: 编码突变型 π 复制蛋白, 该蛋白可高效结合载体上的 R6K γ 复制起点, 启动质粒复制, 使含 R6K γ 复制子的质粒在 PIR1 中维持~250 拷贝/细胞的高拷贝状态, 是野生型 pir 菌株 (PIR2, ~15 拷贝/细胞) 的 16 倍以上。recA1 同源重组酶基因缺陷, 避免载体与细菌染色体发生非特异性同源重组, 同时防止载体自身因重复序列发生重排, 确保载体遗传稳定性。endA: 核酸内切酶 endA 基因缺陷, 消除该酶对质粒的降解, 提升质粒提取质量。hsdR514: 限制酶系统基因缺陷, 丧失对异源 DNA 的切割能力, 避免导入的质粒被大肠内源性限制酶降解, 提高转化效率。PIR1 感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, AmpR) 检测转化效率 $>1 \times 10^8$ cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

1. PIR1 感受态细胞从 -80°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°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 μ l 不含抗生素的无菌培养基 (SOC 或 LB), 混匀后 37°C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心 1 分钟收集菌体, 留取 100 μ 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°C 培养箱过夜培养。

● 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。
2. 混入目的 DNA 时应轻柔操作, 转化高浓度质粒或连接产物可相应减少用于涂板的菌量。
3. 若要获得大量, 高纯度质粒, 建议在 TB 培养基 (唯地 CAT#: CM1018L) 中摇菌培养 (以标准质粒 PUC19 为例: 在 TB 营养液中过夜培养的菌体浓度和质粒产量为 LB 的 3-4 倍, SOC 的 2 倍)