

### SM10- $\lambda$ pir Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: DL3060)

SM10- $\lambda$ pir Competent Cell	100 $\mu$ l /支
pUC19 (control vector, 10pg/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
保存条件 (保质期):	-80 $^{\circ}$ C (6 个月)

#### ● 基因型

*thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu [ $\lambda$ pir]*

#### ● 产品说明

SM10- $\lambda$ pir 是从 SM10 菌株改造而来, SM10 本身是 S17-1 菌株的衍生株。S17-1 是构建用于高效接合转移的经典菌株, 它整合了 RP4 质粒 (也称为 RK2 质粒) 的接合转移装置 (tra 基因) 到其染色体上。整合的 RP4 赋予 S17-1 (以及其衍生株 SM10) 将自身携带的可移动质粒高效地转移给受体菌的能力。在 SM10 的基础上, 通过溶原化的方式, 将  $\lambda$  噬菌体的一个特殊变体  $\lambda$ pir 整合到了染色体上, 即 SM10- $\lambda$ pir, pir 蛋白是 R6K 质粒复制起点 (oriR6K 或 oriV) 的特异性复制起始蛋白。只有表达 pir 蛋白的宿主细胞才能复制带有 oriR6K 复制起点的质粒。tonA: 对噬菌体 T1 具有抗性; lacY:  $\beta$ -半乳糖苷透性酶缺陷, 影响乳糖利用; recA 突变大大降低了菌株自身的重组能力, 有助于保持引入质粒的稳定性, 避免其与染色体或其他质粒发生不必要的重组; RP4-2-Tc::Mu: 这是最核心的特征之一, 这意味着完整的 RP4 质粒 (RK2 质粒) 的接合转移装置 (tra 基因) 被整合到了染色体上, 这赋予了 SM10 (pir) 组成型表达接合转移功能的能力, 使其能作为高效的供体菌; RP4-2 质粒本身有氨苄、卡那、四环素抗性, IS 插入元件灭活相邻的氨苄青霉素抗性基因, Mu 噬菌体序列插入 Tc 元件, 破坏了四环素抗性基因表达框, SM10- $\lambda$ pir 只具有卡那抗性。SM10- $\lambda$ pir 的主要用途就是作为接合转移实验中的供体菌 (Donor), 目标受体菌可以是其他革兰氏阴性菌, 如沙门氏菌、志贺氏菌、假单胞菌、耶尔森菌、霍乱弧菌等。SM10- $\lambda$ pir 感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp<sup>R</sup>) 检测转化效率 >10<sup>8</sup> cfu/ $\mu$ g DNA。

#### ● 操作方法

1. SM10- $\lambda$ pir 感受态细胞从 -80 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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  $\mu$ l 不含抗生素的无菌培养基 (LB), 混匀后 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心 1 分钟收集菌体, 留取 100  $\mu$ l 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 LB 培养基上。
5. 将平板倒置放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养 (12-15 h)。

#### ● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰中融化。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. 转化高浓度的质粒或高效率的连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。
3. SM10- $\lambda$ pir 有卡那抗性, 不能用于卡那霉素抗性质粒的转化。
4. 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)