

苏云金芽孢杆菌 AS1.16 Electroporation-Competent Cell 说明书

● 产品规格和内容

产品名称	货号：BTE1050S	货号：BTE1050M	保存条件/时间
苏云金芽孢杆菌 AS1.16 Electroporation-Competent Cell	100μl/ 5 支	100μl/ 20 支	-80℃（6 个月）
pHT20 (control vector, 10 ng/μl)	10μl/ 1 支	10μl/ 1 支	-80℃（6 个月）
Bt 孵育培养基 BtB	5ml/ 1 支	5ml/ 4 支	常温（6 个月）

● 产品说明

苏云金芽孢杆菌 AS1.16 电击感受态细胞只能用于电击转化，不能用于热激转化。苏云金芽孢杆菌 AS1.16 菌株的中国科学院微生物研究所菌种保藏中心编号为 AS1.16。苏云金芽孢杆菌是革兰氏阳性杆菌，兼性厌氧，能形成芽孢 + 伴孢晶体（Bt 典型特征），周身鞭毛，可运动，LB 培养基上生长良好，菌落乳白色、扁平、边缘不整齐，主要杀鳞翅目幼虫（菜青虫、小菜蛾、玉米螟、棉铃虫、松毛虫等），是典型的农业 / 林业生防菌株。苏云金芽孢杆菌的杀虫机制：产生伴孢晶体（Cry 蛋白， δ -内毒素）→ 昆虫中肠碱性环境激活毒素 → 肠壁穿孔 → 停止取食、败血症死亡。苏云金芽孢杆菌 AS1.16 的主要用途：可杀鳞翅目昆虫。唯地生物开发的苏云金芽孢杆菌 AS1.16 电击感受态细胞适用于各种大小质粒(5kb-60kb)的转化，经特殊工艺制作，pHT20 质粒（ErmR）检测转化效率 $>10^4$ cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

质粒准备（去除甲基化）：将待转化质粒转入 WD026 感受态【唯地货号：DL5001】或 JM110 感受态【唯地货号：DL1025】，从 WD026 或 JM110 菌中提取质粒，用 ddH₂O 溶解质粒，质粒浓度控制在 200-500ng/ul。

附言：WD026 是 JM108 的衍生菌株，集合了 JM110、JM108 两个菌株的优点，从中提取的质粒转化效率更高。

1. 取适量 BtB 孵育培养基放 30 度预热 1 小时（每管感受态准备 1ml）。
2. 0.2 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟沥干水分，正置 5 分钟，待乙醇挥发干净立即插入冰中，压实冰面，电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖，冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取 -80℃ 保存的苏云金芽孢杆菌电击感受态细胞插入冰中 5 分钟，待其融化，加入目的 DNA，并用手拨打 EP 管底轻轻混匀，避免产生气泡，立即插入冰中。DNA 样品的离子浓度越低，转化效率越高。离子浓度较高的 DNA 溶液或反应体系请用膜纯化或乙醇沉淀法纯化 DNA，ddH₂O 溶解后电击转化。
4. 用 200 μ l 枪头(用刀切除 0.5cm 枪尖)将感受态-DNA 混合物快速移到电击杯中（避免产生气泡），轻轻晃动使液面保持水平状态，盖上杯盖，插入冰中。
5. 启动电转仪，设置参数：C=25 μ F，PC=200 Ω ，V=2.2 kV，将电击杯从冰中拿出，用吸水纸擦拭表面，吸干表面水渍，放入电转槽中，电击完成后拿出电转杯放室温，打开杯盖，尽快内加入 1ml 预热的 BtB 孵育液，用 1ml 枪吹吸电击杯底部 2-3 次，混匀后转移到 5-50 ml 透气试管中，30℃，225 rpm 复苏 3 小时。

6. 5000 rpm 离心一分钟收菌，重悬后取 100-200 μ l 涂布到含相应抗生素的 LB 平板上，30° C 倒置培养过夜。感受态包装内的标准质粒 pHT20 为红霉素抗性，若转化此质粒，平板应含有红霉素 3ug/ml【唯地货号：YC9081L】。
7. 对于不确定转化效率的感受态或质粒需梯度稀释后涂板，可用 LB 液体进行 10 倍系列稀释（如 10^{-1} 、 10^{-2} ），避免菌液浓度过高导致平板菌落重叠。
8. 红霉素浓度选择：苏云金芽孢杆菌质粒多用红霉素筛选，不同质粒的红霉素表达框不同，表达强弱有差异，一般红霉素可用范围在 2-5ug/ml 之间，如果抑制不住不含质粒的细胞生长可适当调高红霉素浓度到 5-15ug/ml。

● 注意事项

1. 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。典型的苏云金芽孢杆菌菌落乳白色、扁平、边缘不整齐。
2. 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。每个电击杯最多用 5 次。
3. 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。
4. 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。
5. 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。质粒增大一倍，转化效率下降一个数量级。
6. 混入质粒时应轻柔操作，吸取感受态细胞时避免用力过猛，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。
7. 电击感受态细胞最好保存在 -80°C 以下，高于 -80°C 超期储存会导致转化效率下降。