

IPTG/X-Gal 即用型溶液

产品编号	产品名称	规格
BL545A	IPTG 50 mg/ml	5 ml
BL546A	X-Gal 20 mg/ml	5 ml

产品简介:

蓝白斑筛选是重组子筛选的一种方法。现在使用的许多载体都带有一个大肠杆菌的DNA的短区段，其中有 β -半乳糖苷酶基因（lacZ）的调控序列和前146个氨基酸的编码信息。在这个编码区中插入了一个多克隆位点（MCS），它并不破坏阅读框，但可使少数几个氨基酸插入到 β -半乳糖苷酶的氨基端而不影响功能，这种载体适用于可编码 β -半乳糖苷酶C端部分序列的宿主细胞。因此，宿主和质粒编码的片段虽都没有酶活性，但它们同时存在时，可形成具有酶学活性的蛋白质。这样，lacZ基因在缺少近操纵基因区段的宿主细胞与带有完整近操纵基因区段的质粒之间实现了互补，称为 α -互补。由 α -互补而产生的LacZ⁺细菌在诱导剂IPTG的作用下，在生色底物X-Gal存在时产生蓝色菌落，因而易于识别。然而，当外源DNA插入到质粒的多克隆位点后，几乎不可避免地导致无 α -互补能力的氨基端片段，使得带有重组质粒的细菌形成白色菌落。这种重组子的筛选，又称为蓝白斑筛选。如用蓝白斑筛选则经连接产物转化的钙化菌平板37℃倒置培养12-16hr后，含有插入片段重组质粒的细菌形成白色菌落，而没有插入片段的质粒细菌形成蓝色菌落。

配制方法:

50mg/ml IPTG 5 ml: 取250 mg IPTG，溶于5 ml无菌水中，过滤除菌后-20℃贮存。

20mg/ml X-Gal 5 ml: 取100 mg X-gal，溶于5 ml 二甲基甲酰胺（DMF），棕色瓶中-20℃贮存。此试剂无需灭菌。

实验程序:

1、转化平板的制备:

向铺好的含有相应抗生素的固体琼脂平板表面加入16 μ l的IPTG(50 mg/ml)、40 μ l的X-gal (20 mg/ml)，使用无菌的弯头玻璃棒将其均匀的涂开，尽量使溶解X-gal的二甲基甲酰胺挥发干净。

2、转化

(1) 取部分连接产物加到50-100 μ l感受态细胞中（感受态细胞应刚从-70℃冰箱取出放于冰浴上，待刚刚解冻时加入连接产物，连接产物的加入量不超过感受态细胞体积的十分之一），轻弹混匀，冰浴30分钟。

(2) 将离心管置于精确42℃水浴90秒，取出管后立即置于冰浴中放置2-3分钟，其间不要摇动离心管。

(3) 向离心管中加入250-500 μl 37℃预热的SOC或LB(不含抗生素)培养基，150rpm，37℃振荡培养45分钟。此步目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。

(4) 将离心管中的菌液混匀，吸取100 μl加到含相应抗生素的SOB或LB固体琼脂培养基上，用无菌的弯头玻棒轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37℃培养12-16小时。

3、检测

将得到的白色菌落接种 1-5 ml LB 培养基，37℃摇床振荡培养过夜，保存菌种后提取质粒，应用 PCR 或酶切方法鉴定插入片段是否正确。

保存条件：

-20℃保存，至少一年有效。