

Stbl2 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE1045)

Stbl2 Electroporation-Competent Cell	50 μ l /支
pUC19 (control vector, 10pg/ μ l)	10 μ l
保存条件 (保质期):	-80 $^{\circ}$ C (6个月)

● 基因型

F- *mcrA* Δ (*mcrBC-hsdRMS-mrr*) *recA1 endA1 lon gyrA96 thi supE44 relA1* λ Δ (*lac-proAB*)

● 产品说明

Stbl2 菌株来源于 JM109 *E. coli* strain, 适合克隆不稳定插入片段 (正向重复序列, 逆转录病毒序列等); *mcrA* 突变和 *mcrBC-hsdRMS-mrr* deletion 使该菌株更适于克隆甲基化的基因组序列; 同时 Stbl2 也可用于慢病毒载体的构建。 *recA 1* 和 *endA1* 的突变有利于克隆 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。不存在 *lacI^qZ Δ M15*, 不可用于蓝、白斑筛选。Stbl2 电击感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 >10¹⁰ cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

1. 取适量 SOC 放 37 度预热 1-2 小时 (每管感受态准备 10ml SOC)。
2. 0.1 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, 待其沥干水分, 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 $^{\circ}$ C 保存的 Stbl2 电击感受态细胞插入冰中 5 分钟, 待其融化, 加入目的 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨打 EP 管底轻轻混匀, 避免产生气泡, 立即插入冰中。
 - A. 测定转化效率使用 1 μ l 10 pg/ μ l 的对照质粒 pUC19;
 - B. 对于连接产物, 部分公司的 T4 连接酶体系或重组体系可与电击感受态混合后电击转化, 无需进行 DNA 纯化, 但 DNA 浓度不能过高, DNA 浓度不超过 100 ng/ μ l, 体积不超过 5 μ l/50 μ l 感受态。
 - C. 对离子浓度较高的 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, 盖上杯盖。
5. 启动电转仪, 设置参数: C=25 μ F, PC=200 Ω , V=1.8 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, 15 秒内加入 0.9ml 预热的 SOC (此步骤可在电转仪旁操作, 无需在超净台操作), 用 1ml 枪吹吸电击杯底部 2-3 次, 混匀后转移到 50 ml 离心管 (BD Falcon 50 ml 离心管等), 向离心管中补加 S.O.C. 培养基至 10 ml。37 $^{\circ}$ C, 225 rpm 复苏 60 分钟。当质粒中含有不稳定片段时, 30 $^{\circ}$ C 培养可降低错误重组的概率, 若转化 control pUC19 计算转化效率, 则需 37 $^{\circ}$ C, 225 rpm 复苏 60 分钟

- 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 S.O.C 平板上（因菌量较大，若全部涂板请选用直径 15cm 培养皿 2-5 个）。将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养 13-17 小时或 30°C 培养箱过夜培养 15-20 小时。
- 若要获得大量，高纯度质粒，建议在 TB 培养基（唯地 CAT#: CM1018L）中 30 度/37 度摇菌培养（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，SOB 的 2 倍）

● 培养基配方：

S.O.C 培养基（唯地 CAT#: CM1014L）PH 7.0	TB 培养基（唯地 CAT#: CM1018L）PH 7.2
2% Tryptone	1.2% Tryptone
0.5% Yeast Extract	2.4% Yeast Extract
10 mM NaCl	0.4% 甘油
2.5 mM KCl	0.231% KH ₂ PO ₄
10 mM MgCl ₂	1.254% K ₂ HPO ₄
10 mM MgSO ₄	TB 培养基中添加 0.017M 磷酸二氢钾和 0.072M 磷酸氢二钾成分，在大肠杆菌进入稳定后期可以稳定培养基 pH 值，提高菌体密度。
20 mM glucose	
S.O.C. is suitable for use in the final step of cell transformation to obtain maximal transformation efficiency (Hanahan, 1983).	

● 注意事项

- 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。质粒增大一倍，转化效率下降一个数量级。
- 对于连接产物转化，部分公司的连接体系或重组体系(例如：Thermo, NEB 公司的 T4 连接酶系统, NEB, 天根的 50 度反应重组系统)可以直接与 EPI300 电击感受态混合后电击转化，无需纯化，但 DNA 浓度不能过高，最好不要超过 100 ng/ μ l。过高浓度连接产物或过大体积连接产物会降低转化效率，增加弧光放电的风险。
- 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。
- 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会下降。