

### BL21(DE3) Electroporation-Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: EE1002)

BL21(DE3) Electroporation-Competent Cell	50 $\mu$ 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

F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm(DE3)

#### ● 产品说明

BL21(DE3)为 Lon 蛋白酶和 OmpT 外膜蛋白酶缺陷菌株。λ 噬菌体 DE3 区含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶，该区整合于 BL21 的染色体上，所以称为 BL21(DE3)。BL21(DE3)菌株可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶，用于 pET 系列，pGEX，pMAL 等质粒的蛋白表达。BL21(DE3)电击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 $>1 \times 10^{10}$  cfu/ $\mu$ g DNA，可用于各种多肽，蛋白表达文库的构建。

#### ● 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 BL21(DE3)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  $\mu$ l 10 pg/ $\mu$ l 的对照质粒 pUC19;
  - B. 对于连接产物，请用乙醇沉淀 DNA 后加入适量 ddH<sub>2</sub>O 或 TE 缓冲液 (10 mM Tris HCl, pH7.5; 1 mM EDTA)重悬，DNA 浓度不超过 100 ng/ $\mu$ l，体积不超过 5  $\mu$ l/50  $\mu$ l 感受态。
4. 用 200  $\mu$ 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  $\mu$ F，PC=200  $\Omega$ ，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，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。
6. 5000 rpm 离心一分钟收菌，加入适量 SOC 重悬后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 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养 13-17 小时。

● S.O.C 培养基配方 (唯地 CAT#: CM1014L) :

2% Tryptone  
0.5% Yeast Extract  
10 mM NaCl  
2.5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
20 mM glucose  
PH-7.0

S.O.C. Medium is suitable for use in the final step of cell transformation to obtain maximal transformation efficiency of *E. coli* (Hanahan, 1983).

● 注意事项

1. 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。
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。
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。质粒增大一倍，转化效率下降一个数量级。
6. 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 BL21(DE3)电击感受态混合后电击转化，无需纯化，但 DNA 浓度不能过高，最好不超过 100 ng/μl。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。
7. 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。
8. 电击感受态细胞最好保存在 -80℃ 以下，高于 -80℃ 超期储存会导致转化效率下降。