

Stable Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE1080)

Stable Electroporation-Competent Cell	50μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (6个月)

● 基因型

F' *proA+B+ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzzf::Tn10 (Tet^R) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80ΔlacZ ΔM15recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS -mcrBC)*

● 产品说明

Stable 电击感受态细胞只能用于电击转化,不可用于热激转化。Stable 菌株是 NEB 公司开发的高转化效率菌株,是逆转录病毒/慢病毒载体系统推荐使用的菌株,特别适合慢病毒或具有末端重复序列 DNA 片段的克隆。基因组含有重组酶 *recA1* *relA1* 突变,可有效抑制长片段末端重复区的重组,降低错误重组的概率;同时含有核酸酶 *endA1* 突变,避免了提取质粒过程中核酸酶的污染,大大提高了高纯度病毒质粒的产量和质量。*lacZΔM15* 的存在使 Stable 可用于蓝、白斑筛选,此菌株具有四环素和链霉素抗性。唯地生物开发的 Stable 电击感受态细胞适用于大质粒的构建或者各种具有末端重复序列的复杂 DNA 文库构建,经特殊工艺制作, pUC19 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 >1×10¹⁰ cfu/μg 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°C 保存的 Stable 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 μl 10 pg/μl 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/μl,体积不超过 5 μl/50 μl 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 μl 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 μF, 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。30°C, 225 rpm 复苏 90 分钟。当质粒中含有不稳定片段时,30°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°C, 225 rpm 复苏 60 分钟
6. 5000 rpm 离心一分钟收菌,重悬后取 100-200 μl 涂布到含相应抗生素的 LB 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 30°C 培养箱过夜培养 20-24 小时。
7. 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 0.5% Yeast Extract 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM glucose S.O.C. is suitable for use in the final step of cell transformation to obtain maximal transformation efficiency (Hanahan, 1983).	1.2% Tryptone 2.4% Yeast Extract 0.4% 甘油 0.231% KH ₂ PO ₄ 1.254% K ₂ HPO 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。

● Stable 菌株使用常见问题

1. 在使用 Stable 感受态时怎样提高病毒质粒的产量?

答：为了提高 Stable 菌株中的病毒质粒产量，可采用以下方法：

A, 接菌时用新鲜的菌斑，不要使用 4℃ 保存的菌落接菌，摇菌时用大体积容器，225 rpm，增加溶氧量。

例如：小提质粒时，50 ml 离心管中接入 6 ml LB 菌液，羧苄青霉素 50 μg/ml，接新鲜克隆，37℃，225rpm 摇菌 20 小时；大提质粒时，2L 离心瓶中接入 200ml LB 菌液，羧苄青霉素 50 μg/ml，接新鲜克隆，37℃，225 rpm 摇菌 20 小时。

B, 对不稳定的克隆或病毒质粒优先以质粒状态保存，尽量避免将质粒保存在大肠杆菌细胞中。对摇好的菌液应立即提取质粒，不可将菌液在室温或低温放置一段时间后提取质粒。

● 注意事项

1. 对不稳定 DNA 片段的克隆或逆转录病毒/慢病毒载体的构建，涂板后平板应在 30℃ 培养，以减少发生错误重组的概率。
2. 制备高纯度病毒质粒时，应使用新鲜转化的平板接菌，新鲜菌液提取质粒，菌液不可低温保存后提取质粒。
3. 感受态细胞最好在冰中缓慢融化。插入冰中 10 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。混入目的 DNA 时应轻柔操作。加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 若转化大质粒或想获得高转化效率，推荐使用高纯质粒提取试剂盒提。质粒增大一倍，转化效率下降一个数量级。
8. 对于连接产物转化，最好转化前乙醇沉淀 DNA 后用适量 TE 缓冲液 (10 mM Tris HCl, pH7.5; 1 mM EDTA) 重悬产物，保证 DNA 浓度不超过 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。
9. 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。