

MDS42 recA Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DL3051)

MDS42 recA Competent Cell	100μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件 (保质期) :	-80°C (6 个月)

● 基因型: F-λ- lacZΔM15 recA1819 ΔendA ΔfhuACDB Δ699gene

● 产品说明

MDS42 recA 菌株来源于 MDS42 菌株, 大肠杆菌基因组中含有大量非必需 DNA(包括复合转座子、简单转座子 (IS)、噬菌体/病毒序列/残留片段、假基因等), 这些非必需 DNA 的存在可导致基因组不稳定或提高大肠杆菌突变体产生的概率, 在构建一些含有毒性基因片段、噬菌体片段或其他原核基因组片段的质粒时往往导致质粒结构的不稳定或质粒中部分片段的丢失, 或错误重组。为了降低大肠杆菌基因组中这些无效 DNA 或有害 DNA 的影响, 提高大肠杆菌基因组和质粒 DNA 的稳定性, 利用合成生物学的方法, 删除 E.coli K-12 系野生型 MG1655 菌株的非必需 DNA, 同时保留细菌生长和质粒复制, 蛋白表达所需的必需基因, 产生了 MDS (Multiple-deletion Series) 菌株, MDS42 为筛选出的第 42 号株系, 此菌株共删除了 704 个基因 (MG1655 菌株基因组含有 4,639,675 个碱基, 约 4434 个基因; MDS42 菌株基因组含有 3,976,359 个碱基, 约 3730 个基因, 缺失了 663,316 个碱基, 占 MG1655 基因组的 14.30%), 其中 fhuABCD 四个基因的突变赋予 MDS42 recA 菌株对噬菌体 T1 的抗性; lacZΔM15 使其可以用于蓝白斑筛选实验; 核酸酶 endA 的删除有利于体内质粒 DNA 的稳定和高纯度 DNA 的提取; 另外还有 699 个基因被成功删除。将 recA1819 突变引入 MDS42 即是 MDS42 recA, 重组酶 recA1819 突变可降低错误重组的概率, 提高质粒稳定性。MDS42 recA 感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, AmpR) 检测转化效率 >10⁸ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. MDS42 recA 感受态细胞从 -80°C 拿出, 迅速插入冰中, 5 分钟后待菌块融化, 加入目的 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨打 EP 管底轻轻混匀(避免用枪吸打), 冰中静置 25 分钟。
2. 42°C 水浴热激 45 秒, 迅速放回冰上并静置 2 分钟, 晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 900 μl 不含抗生素的无菌培养基 (SOC 或 LB), 混匀后 37°C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心 1 分钟收集菌体, 留取 60 μl 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 SOC 或 LB 培养基上, 将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。如果进行蓝白斑筛选, 将平板放 37°C 培养至少 16 h。

● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰中缓慢融化。插入冰中 8 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, 转化高浓度的质粒或连接产物可减少用于涂板的菌量。
2. 若要获得大量, 高纯度质粒, 建议在 TB 培养基 (唯地 CAT#: CM1018L) 中摇菌培养 (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, SOC 的 2 倍)