

### Stbl3-A Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: DL1046-A)

Stbl3-A Competent Cell	100 $\mu$ 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- *mcrB mrr hsdS20*( $r_B^{-}$ ,  $m_B^{-}$ ) *recA13 endA supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20* (Str<sup>R</sup>) *xyt-5  $\lambda$ leu mtl-1*

#### ● 产品说明

Stbl3-A 菌株来源于 Stbl3 菌株, 由唯地生物将 Stbl3 基因组中的核酸酶 *endA* 突变, 同时筛选更低错误重组率的菌株改造而来, 是目前最适合慢病毒载体系统使用的菌株, 错误重组率比 Stbl3 更低, 能够克隆和维持传统克隆菌株难以处理的不稳定质粒 DNA 序列, 如含有正向重复、倒位重复或易发生非预期重组事件的 DNA 序列, 在处理慢病毒、逆转录病毒 DNA 相关克隆时更具优势, 使困难的克隆工作更可靠、高效。基因组含有重组酶 *recA13* 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。Stbl3-A 菌株具有链霉素抗性, 不存在 *lac<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15*, 不可用于蓝、白斑筛选。此外在 Stbl3-A 基因组中 *mrr*、*hsdS20*、*mcrB* 几个基因位点被突变, 可提高转化效率。Stbl3-A 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 >2  $\times 10^9$  cfu/ $\mu$ g DNA。

#### ● 操作方法

1. Stbl3-A 感受态细胞从 -80 $^{\circ}$ 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 管底部轻轻混匀(避免用枪吸打), 冰中静置 25 分钟。
2. 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 45 秒, 迅速放回冰中并静置 2 分钟, 晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 0.9 mL 室温 S.O.C. 或 LB 培养基(S.O.C. 营养丰富, 可提高转化效率)。
4. 37 $^{\circ}$ C, 225 rpm 复苏 60 分钟或 30 $^{\circ}$ C, 225 rpm 复苏 90 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
5. 5000 rpm 离心 1 分钟收菌, 留取 100  $\mu$ l 左右上清吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 S.O.C. 或 LB 培养基上。
6. 将平板倒置放于 37 $^{\circ}$ C 或 30 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养。  
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 培养过夜

#### ● 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, 涂板后应在 30 $^{\circ}$ C 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使用。
3. 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。
4. S.O.C. 或 LB 培养基均可使用, S.O.C. 可提高转化效率 20%; 实验人员可选择在 37 $^{\circ}$ C 或 30 $^{\circ}$ C 培养细胞, 37 $^{\circ}$ C 条件下, 菌生长速度加快, 有利于提高质粒产量, 30 $^{\circ}$ C 培养可降低错误重组概率。若要获得大量, 高纯度质粒, 建议在 TB 培养基 (唯地 CAT#: )

CM1018L) 中培养 (以标准质粒 PUC19 为例: 在 TB 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)。

5. 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高效率的连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。

### ● Stbl3-A 菌株使用常见问题

#### 1. 在使用 Stbl3-A 感受态时怎样提高病毒质粒的产量?

**答:** A, 接菌时用新鲜的菌斑, 不要使用 4°C 保存的菌落接菌, 摇菌时用大体积容器, 300 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°C, 300rpm 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°C, 300 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。

C, 用 TB 培养基 (唯地 CAT#: CM1018L) 摇菌 (以标准质粒 PUC19 为例: 在 TB 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)。

#### 2. 可以用 TOP10 或 DH5α 代替 Stbl3-A 或 Stable 扩繁病毒质粒吗?

**答:** 可以代替, Stbl3-A 菌株和 Stable 菌株在病毒构建和扩繁过程中具有很低的错误重组概率, 我们推荐在试验中优先使用。普通大肠杆菌如 TOP10 或 DH5α 也可以扩繁病毒质粒, 只是产量要低一些, 并且在扩繁过程中容易产生错误重组, 导致一些必要元件的删除, 当使用 TOP10 或 DH5α 时, 最好在 30°C 摇菌, 采用低盐浓度的 LB 溶液 (5 g/L 氯化钠) 以降低错误重组的概率。

#### 3. 在使用 Stbl3-A 或 TOP10 感受态细胞构建或扩繁病毒质粒时, 经常会看到在平板上长出偏小或偏大的克隆, 我应该选择哪种克隆进行后续实验?

**答:** 我们推荐挑选直径偏小的克隆进行后续实验, Stbl3-A 和 TOP10 菌株在构建或扩繁病毒质粒过程中都有可能产生末端重复区的错误重组 (Stbl3-A 菌株错误重组率约为 30%; TOP10 菌株错误重组率约为 70%), 发生错误重组的病毒质粒赋予该克隆生长速度加快的优势, 因而产生直径偏大的克隆。

#### 4. Stbl3-A 平板过夜培养菌落很小, 并且小摇时摇菌很长时间菌液依然很淡, 这种情况怎么解决?

**答:** 这是正常结果, 与 DH5α 或 TOP10 这种常用克隆菌株相比, Stbl3-A 生长速度确实很慢, 所以平板在 37 度时需要 15-18h, 在 30 度需要 24h。Stable 菌株对融氧要求较高, 小摇时应增大液面面积与液面高度的比值, 这样才能在摇菌时使液面产生起伏波动, 增加融氧, 加快菌株生长。