

Ecn 1917(Δ pMUT1/ Δ pMUT2) Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DL3043)

Ecn 1917(Δ pMUT1/ Δ pMUT2) Competent Cell	100 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

E.coli Nissle 1917 O6:K5:H1 EndA⁺ Dam⁺ Dcm⁺ Δ pMUT1 Δ pMUT2

● 产品说明

大肠杆菌菌株 Nissle 1917 是一种非致病的共生大肠杆菌分离物, 1917 年由德国微生物学家 Alfred Nissle 从一名未感染痢疾的士兵肠道中分离出一株大肠杆菌, 这个菌株可以作为药物治疗其他感染者, 后来被命名为 Nissle 1917, 通常也缩写为 EcN。EcN 是一株未经过改造的野生型大肠杆菌菌株, 不产生任何肠毒素或细胞毒素 (肠毒素是由某些微生物产生的毒素, 可引起胃肠道症状)。EcN 属血清 06:K5:H1 型, 其 LPS 侧链较短, 且 K5 型荚膜具有血清敏感性, 在体内易被血清清除, 因此 EcN 不具致病性。EcN 可以抑制肠道内病原菌的生长, 防止病原菌在肠道内定植, 同时具有抗炎作用。EcN 在临床上主要用于胃肠功能障碍性疾病的治疗, 例如克罗恩病、炎症性肠病及便秘等。本公司的 Ecn 1917(Δ pMUT1/ Δ pMUT2) 菌株是不含两个野生型辅助质粒 pMUT1、pMUT2 的菌株, 这两个质粒无已知功能, 无明显的筛选标记, 但在大肠杆菌中可稳定存在, 可作为 EcN 菌株的鉴定标准质粒使用, 唯地生物利用毒性基因替代法将这两个质粒敲除, 获得 Ecn 1917(Δ pMUT1/ Δ pMUT2) 菌株, 常用作动物体内试验 (激活 T 细胞、肿瘤治疗、靶向释放蛋白、抗动脉粥样硬化等试验)。Ecn 1917(Δ pMUT1/ Δ pMUT2) 菌株的核酸酶 endA1 为野生型, 体内核酸酶含量较高, 提取质粒时务必使用质粒提取试剂盒中去蛋白液尽量去除核酸酶对质粒的污染, 防止质粒降解; 另外染色体中携带有功能的 Dam、Dcm 甲基化酶; 不可用于蓝、白斑筛选。Ecn 1917(Δ pMUT1/ Δ pMUT2) 感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, AmpR) 检测转化效率 $>1 \times 10^7$ cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

1. Ecn 1917(Δ pMUT1/ Δ pMUT2) 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, 加入目的质粒, 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 $^{\circ}$ 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 700 μ l 不含抗生素的无菌培养基 (2YT 或 LB), 混匀后 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 5000 rpm 离心 1 分钟收集菌体, 留取 100 μ l 左右上清重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 LB 培养基上。
5. 将平板倒置放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养。

● 无质粒 Ecn 1917(Δ pMUT1/ Δ pMUT2) 的优点

1. 遗传稳定性和操作简便性：消除内源质粒不兼容风险，pMut1 和 pMut2 有自己的复制子。当引入新的外源质粒时，可能会发生复制子不兼容，导致外源质粒无法稳定维持或被“排挤”掉。无质粒菌株完全消除了这一风险，极大地提高了外源质粒的转化效率和稳定性。
2. 减少基因工具间的相互干扰：pMut1 和 pMut2 上携带的基因（如编码细菌素、调控蛋白等）可能会与引入的基因发生不可预测的交叉干扰。例如，它们可能表达某些调控蛋白，影响外源启动子的活性。无质粒菌株提供了一个“干净”的遗传背景。
3. 减少代谢负担，优化细胞性能：维持和复制质粒需要消耗宿主细胞的能量和资源。去除 pMut1 和 pMut2 可以减轻细胞的代谢负担，提高外源蛋白表达量，这对于治疗性蛋白至关重要，通常能带来更高的生长速率和蛋白产量。
4. 增强生物安全性和环境可控性：防止基因水平转移，pMut1 和 pMut2 有可能转移到环境中的其他细菌（包括肠道内的益生菌、病原菌等）中。无质粒菌株从根本上切断了基因转移的途径，生物安全性更高。

● 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。
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）。