

E.coli nissle 1917 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE3040)

E.coli nissle 1917 Electroporation-Competent Cell	50 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⁺ Dcm⁺

● 产品说明

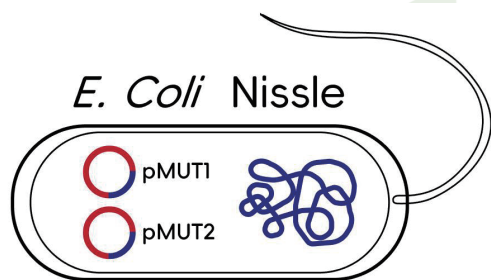
E.coli nissle 1917 电击感受态细胞只能用于电击转化,不能用于热激转化。大肠杆菌菌株 Nissle 1917 是一种非致病的共生大肠杆菌分离物,1917年由德国微生物学家 Alfred Nissle 从一名未感染痢疾的士兵肠道中分离出一株大肠杆菌,这个菌株可以作为药物治疗其他感染者,后来被命名为 Nissle 1917,通常也缩写为 EcN。EcN 是一株未经改造的野生型大肠杆菌菌株,不产生任何肠毒素或细胞毒素(肠毒素是由某些微生物产生的毒素,可引起胃肠道症状)。EcN 属血清 06:K5:H1 型,其 LPS 侧链较短,且 K5 型荚膜具有血清敏感性,在体内易被血清清除,因此 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 E.coli Nissle 1917 菌株来源于 Mutaflo^r 的 EcN 益生菌,是一种非致病性微生物,食用后可以促进消化系统健康;该 EcN 株系胞内含有两个野生型辅助质粒 pMUT1 (3173bp)、pMUT2 (5514bp),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,也可作为 EcN 菌株的加工平台,对 pMUT1、pMUT2 进行加工改造可连入外源基因,可表达蛋白或引入外源小 RNA 分子等。EcN 菌株核酸酶 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酶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 Dcm 甲基化酶;不可用于蓝、白斑筛选。E.coli nissle 1917 感受态细胞经特殊工艺制作,pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 >0.4 \times 10¹⁰ cfu/ μ g 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 E.coli nissle 1917 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 μ l 10 pg/ μ l 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/ μ l,体积不超过 5 μ l/50 μ l 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 μ 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 μ F, 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。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 μ l 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°C 培养箱过夜培养 13-17 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 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)

● 质粒信息



● pMUT1 (3173bp) 质粒序列:

```
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTC
CGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCA
CGCTGTTGGTATCTCGGTTCCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCA
GCCCCACCGCTGCGCCTTATCCGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTAACGCCAC
TGGCAACGGCCACTGGTAAGCAGGATGTGCGAGAGATGTAACGAGAGTTCTTGAAGTGGCGGCCTAACTG
AGGCTACACTGAAAGGACAGTATTTGGTGACATGTCTCGCACAAGACTGTTACCACGGTTAGAGAATCTGCC
AGGATTAACAACTTCGAAAAACCACTGCCAGGGTGGTTTTTTCGTTTTTACAATAGTGAGATTACGACGA
GACTGAATGAATCTCAAGATTTCAATTTAGCCTGCCGCTCGATCATTCAAAGTTTTGAGGTAGCTTCATTGGGT
CATGGTATCCAAGCTCTAAAAGCTTTATATGGTTCGGTGTGAGCCGCTGGAAATGAATAACCCAGTCAGAAAC
CTTGATTTCCCATGAAACGTATCTTTAAAAACCGGATCGCCTAAATGAGCATGCCATAATTTGTTAGCTCTAG
CATACTTCTCAATAGCTTCTTTGTTTTCGTAATGATCAGGCACTTTCCACGATGGCGATACTTTGCCAGTCCAA
GCTGGATATCCTTTAAAGGATCGCCAAAGAGATTGATTTTTCAAATGCTCAATGAAATCATCGATTTTATCG
AGTGTTTTTGCAGAATATCTGGATGTGTAATAAAGGTTGAAGTCTCAGAGAATGAGACAATATTCAATTGTG
```

GATTTTGC GCGCCTGCTCCGCTGCCATGCTCTTCTGCTCCCGACTTAGACCAGATGGCATTGTAACAGA
CTTCTCATTGCTCTGGAAATCAACAGAGACAAGGATACGCCAAAAACCTCAATATCTTTAACAAGATCATGA
CGTTGTTCCGTTTTTCATATCGCTAACTCCGTATCTAATTCAGGCAGGAAAAATCTTTTCTCGTTTTTCAGAGT
AGTCTTTTTTGGTTGCACAATAATGGCGCCAGTGTACCCTATTCATATGAATATACCATATAATATATACTTTAA
ATATTTTGGGGCTTAGGAAAAATCAATGACTTACTCCGTTAAGAATAAATGGAAAGCTGGCGGTTTTGTCTCTTG
GCTGGACAGCAGTGCCTACCCTATTGTTTTTATACAAAACGAGAAAAAGCTAACTTCAGTGGCCTTTAACAC
ACTACTTAACCTGATCGTTCACTGGTGGAGTTTGCAAGAGTGGCCGCATCCGTCAATGGAAAGTCTAGCCAT
ACGTATGGGGTTTTCTGTACGGACTGTTTCAGAGAGCTATCAATGATCTTGAAAAAGCTAATCTCTTGGACAAG
AAACCAACATCGAAGAGTGATCGCCGATATGGTGGTCGCAATATTTATGATCTAACAAAGCTAGTTGACTACC
TAGATACAATGGGTCCATCAGTAGCTGAACAAGTTAAGAAACCACGCCATAAAAAACCGGTATATACCGTAAG
AAAAACGACAGCTTAAAAAGCACAATGAACTGAGCGCGAGCGATGCACGATAGCAAAACGATATATTACTT
ATTGCATTGGTCTTGGTAGCCCTGCTTCTGGCTAAACCACTGTCAGGAGTAATTGGCTTTCCTGTAATGGG
TTCATCGCTTCACAGTTAAAGTTATCGCATAGCTCATATATTACCATAATCCCTAATTGTACGCACCACTGAA
ACGCGCTGAACGCGATTCTGACGCAGACACCGCAAAAAGAGATGTTTTACCCCGAAAAACAGGAAGGATG
CGTCAGGATCGTTTTTCAGCTCGCTGCATAGCTATGCATGAAAGCGAATGGTGTCACTTTGGGAGCTTACGG
TGTTTCATACCGTCAGTTTTTCGACAGTTTTCTCCTCCGGGAAGCTAATCTGCCATAAGCCTGGATAACAGGGCA
CGGTGATACTCCGTAATAGCGATCAGCACCTCCGCATACTCCCTGTCCCGACACGCTTGCCGTCGATAAAG
AGTTTTTCTGTAACGCCCCAGTCTCATAACTTCTTTTCAGTACCCGATCATCAGTCAGTGAGTTAACTTTCTT
ACCGAGAGCTGCCGCCCGTAAAAACCGGAAACGGTCTTGCCGCATTGACGAGCCCTTTTTCTGATTTCTT
GGTCTTCTTCTGCCGTGACAGCAACAGGGCGACTGATAGCCCGCTGCGCGTATTACTTCCACTTCGTTTT
GTCATAAAACATGGCTCCGTATCTGACATGGGTGTCGGGGCAAAGCCCTGACCAGGGCAATTGTAATAGCGT
GCATGTATGCGCGGTATAACAATTGCACATCCTGTCTGTGAGCAAGCTCGAATTACCGACAAAGGCACGGC
AGTTTTTTGGCAGTGACAGTGTTGTCTGACAGAAATGCCCGTCAAAAAGCCAAGCGGCAGAATAGCGGCAG
CAAAACAGTCGAAAAGTGGTACGCGATATAATCACACAACGCAGATGACAGACAGAACGGAGAAAACGAAA
AGATGAATAAGCAGCAGCAAGCCGTACTCAACATGGCGGGATTACATAAAAAGTCAGAGCCTGACGCTGCTC
GAAAAACTGGACGCACTCAATGCCGACGAACAGGCCGCCATGTGTGAGAACTGCACGAACTCGCAGAAG
AACTCCAGAACAGCATAACAGACAGCTTTGAAGCGGAAAATCTTACCGGGATATAACGCATCCGGACAGGAT
GCAGAACGGCATAGAGGAGCGTAAGGAGAAAATGTCACATAAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGAC
TCGCTACGCTCGGTCTTTCGACTGCGGCGAGCGGTGTCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCAC
AGAATCGGGGGATAAAACCGGAAAAGAACATGTGAGCAAAAAGACAAAGACCCAGAAGAAGGGCGCGCGGGA
GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG

● pMUT2 (5514bp) 质粒序列:

GTGATGGCAATGAAAATATCCCAATTGTTGATTTTACAGTGTGGATCTAATATCAAAAAGTTGACTCAATCATT
TTCGTTTTGAGTAAGAATAATGACGACAATTGTATAACCATATACAAGAAGCAATATCCAGTTCAAACCTTATCA

AGAAAAGAAAATAATTTTTATGGGTTTAGCAAAAAAGAACTATCTCGAGTAGATCAAGATATGATTTCTATTGAT
GGTAAGGCATCTCTTGTTTTTGCTGGCGATACGGTATTTATCTACGACCAAAATGTTTTCGAGCGTTTTTTTTGG
CTATAAAGCATGGATAAAAAATGCTGCCACTGATTTTGTAAACAATATGTCCACTCGTTTTAAGGGATTTGTTG
ACTTAAGCAAATTTATTGAGCGAGTAAATAAGATAGTCATGATGCGGATGCTTTTTCTCGGAAGCTAGCTAAG
GCGTATGCTCGAAGCGAAACAAAGCAAACGCTACAAACAATAACAAATGAACATCTTAAGAGTGTTCTAGATG
AAAATGGATATTTAGCAGGTGTTTTAAAGTATAAAAAAGGTGATGCTACGATTTGCATCGCAAGCCATAACCAG
CAAGATACGTTTATCGCTATGGTATCCGAAGGCGTATTGAGATCGTTGATTACAGGCATTGATTATTTAAGCCT
TGGGTCAAAGCGGAAAATATCGTCAGCAGCATCCAATACTACTACCAGTACCACCTTCGGATTCTCTTCCGCT
GCCGTGTGAGACAAAACAACCTATATCAGATAACAGCCCTGCTTTTGCGGGGCTTTTTGTTTGTGCGTGATG
CGACCTCGATGTACGATAGATGCTGTACTAAGCCAGTACACACAGCGTCCCCTCTTCGAGGTGCCGTCTGT
GACTGTTTCAGGGGGCTCGCCGCCCCCGAAACCCCTTGATCCACTGCGAAAATTCGCACTTTGGGTGC
GAAACTTTCTCAGCGGATTCTCATGGAAAAGCGCACCAAAGAGATCAAAATCAGACTCACCGAAGCGGAGC
ATCAGCGGCTACTTGAACGCTGTGACCGTAAGCATTGGCCGAGTGGTTACGAGCCGTTGGCTTAGGCGAA
TCGCGTACAGCTCGGCGTCTCCGCTACCTACCGTAGACCCGACCTTGTTACGTGAGGTCAGCGGGATCG
GTAATAACCTCAATCAAATAGCCCGTTACTTGAATCAGCATGGCTTACCGCCGCAAGAACGGGTGTCGTTGTT
AGCGGTGCTCAATAGCATTGACCAACATCTTGCCGAAGTCTGGAGCAACATCGTGATCGTTAAGATTCATG
GTCGTGGTGCCGGTGCGGGGAGTGGTCCTGTCGATTACCTTCTGGGCCCTGATCGTCAGCGCAACAAGC
GACGGTGTACGGGGTAACCCTGAGCACGTCAAAGAGCTGATTGATGGCTGCGAATTTGCCGAACCTTATA
CCTCTGGCGTGCTCTCTTTTCAGGAGAGTGATTTACCCGAAGGCGAAAAGCAGCGATTGATGGATGAATGG
GAGCAGACATTGATGACCGGTCTAGATAAAGACCAGTATGCCTGCCTCTGGGTTCAACATCAGGACAAAGG
GCGTCTTGAATTGAATTTTGTATCCCGAACATCGAATTGCAGAGCGGAAAACGGCTACAACCTTACTTTGAT
CGGGCTGACCGGCCTCGTGTTAACGCATGGCAAACCCTACCAATGACCGGCTTGGTTACGCGACCCGA
ATGACCCTGCTAATCGCCGAGCATTAAACCCCTCTAATGACCTTCCCTCGCAACAAACAGCAGGCAGCGGAA
GCCATTACCAAAGGGTAATCAGCTTGATTGAGCAGGGAGAAATTACGGATCGTAAAGGGGTGATTTCCAC
CTTACCGATGCCGATTGTGCGTGTACGGGAAACCAAATCCAGTATCAGTATTGCTGATCCGGCAGGTGG
CCCGAATATTCGCTTAAAAGGAGTGCTGTATGAGCGAGATTTAAATTTAGCGCGGGAGTTCGAGAGCAAAT
CGAAGCAGCAAGCCAAGACTACCGCAACGAGCGTCGCGAACGCATTGCGAGAAGCAGAGAAACGTATCAC
CGAGGCCCTTGAATTAAGCTCAGGGAACATACAGACCGCTATCCAAGAAGAGAACGACAGCCAGCTAAAAC
AGATACACCGCTTAGTCGGAATGACATGGCTGTACAGCCTGGCATTAAAGTGGGATCCTGTTTGCATATTGAT
TGGAGTAGCTTGGTATCTCGGGACTATCGTGGTGAACGCCAGAACGAAATCAGCGAGCAGAGCCAGATCC
TGCAGGACTTAAAGAGCCAGACCGGAGCCGGCGTATCGATAATTCACGATTCCAAGAACAAGAGCGTGTATT
ACCTGATCCTTCCGACGGGGGCGAAGAAGATCGACGAGTACAAGAACGCTCAACATCGTCAGGTCATCAAG
TACAGCGCAAATAACCTCATCAGACGCCACAGAATCGATTCTGGGCGGTTTTATCTATCAGGGTGAAGAGA
TTCATGACCGAAATGGAGCAGCAGCTTCTGAGCGCATTAGAGAGCTTACAGAGGCACTACGAACAACAGCA

GCAAGCGTGGCAGGACAGCTACGCCAATTACAGCGCATGTTTCGAGGTTACCTCGCAGGAGTTGGCGAAA
AACGACAGGGTTTGTTCAGGCCTTGAGCATGCAAGTCACCGGCTTGGCGCAGCAAGTCGAGAGCTTAAACA
GAACAGTGCGCCGCTTGAGCAATTAGCCAAGCGGCACGAACAGCGGTATTCTCGCGGTACCGGCATGAGT
TTATAAGCGTTTATCGGCCGCATCGTAAGCGGCAGAACGCTCGCGCTTACCGACCGCCACCACGAATACCG
TAATGGTTTGATCGCGAACCTGATAGACCAAGCGATAACCGGATGCACGGAGCTTGATTTTGTAGCAGTCAT
GCAGCTCTCGCAGGCGATTTTTATCGATCCGCGGGTGTGTAGAACCTGCTCGAGTTTTTTCTTGAAGTCA
GACGGACATCATCCCCGAGCTTGCGCCATTCTTCAGGGCTCGGGGATCAAATTCAGGTTATAGCTCATCC
AGTGACACCTTTACGCCCCCCTGTGGGTTTTCCAGACGATCCCGAACGATAGCCATCAAATCGGCATCATCC
TCGGTCAGCAAAACCTGCTGGAACGGCAAACGTCCGCTTTGGGCCACATATCCAGTGTGGCGCAGAAC
CTCGGACGGCGTTACGCCAGCTTTTCCAGTGCGGCATAAGAGCGGCTTTTCAGCTCGTCATCGATCCGAA
TATTAATCGTGGCCATCATCTCACCTTTGATGTAGTGACAAGTGTATCTACAAGAAGTAGTATGAGCGTAAAG
CCGTGCGAGAACAAGCAGGAATAACGGATTGTCGGGGATGACAAAAACCGTTGTTGAGGTGTAACCTTAGTG
GCAGAAAAACAAGCCCCGAAATCATGCTCTACTTTGGCGAGCGGACATGACATTCAGGGCTAGGTCGAA
ACCTAGAAAGGATATTAGCACATGCAGCGTGCAAAACAACAGCCCCGCCATAAGGCTGGGAGCCTTGATAA
TCAGGCTTTAACGCTTTTTAACGACCGGTTACCCACAAGCCGTACTTCTCCGATGATTTACAGTTTGGTGT
CGCATTGCCGGTAAAGAGCGTGCTCTCCTCGCAAAATACATCCAGTTTAAATCAGCCTCACGCCATGTA
CTTTGCTTTGACGTGGACAGAGCCGGAGCCGCGATTGATTGGGCCGATCTGGGGGCACCTGCGCCACAC
TCACCATCAAAAACCCCGAGAACGGACATGCTCACCTGTTGTATGCCTTGATACGGCGGTACGTACCGCG
CCGGATGGTCGAGCTGCCCCCTTAAATACGCCCGCCATCGAGAATGCGCTGCGTAAAAAATTGGGCGC
AGATGCGGGGTATTAGGGCTAATTTGCAAGAATCCGAACCACCTGCACTGGCAGATCACCGTCTGGCAGC
CAGAGCTCTATACCCTTGACTGGTTAGCCGATTACCTCGACCTTGGCGCAGCCAATGACCGCGAAATCCTG
CCGGACTACGGTTTAGCCGTAACCTGCACCCTTTCGATAAAACCCGCAAGTGGGCTTACCGCGCTATCCG
CCAAGGCTGGCCGAGTATGACCAATGGCTACAAGCCTGCATTGAACGCGCTAAAGCCTACAACCTGCAGT
TCTCCGCACCTTTAGACGAGAACGAAGTCATGGGAATTGCTAAAAGTGTGGCTAAGTGGACAAGTAAGAAC
CTTACAGAGCTTGGCTTTGAAGAGTATGTTAAACAAACACATACTTCTGAAATTCAGCGTCAACGTGGA
AAAGCTCTGGTGGTGAAGGCCGAAAAGTTAGAGATGGAGAATGGATTTCTTAGGAATAAGTAGATCAACGT
GGTACAGGAAATTTACAAAAATGAAAATTAGAATGTATCTTATCAATGTTGTTTTATTATACCGATAACAA
TATATTTTTCTGGTATTGATAACGTATGGTCTGTTTTAGATAAGGCCATGTCTTCGTGTTCTGGCGCGGATGGA
AAATTTCAATGCGTACTCGACTATTCAAATAGCAGATTAACATTTTCTGTATTGAGGTCAGTATCTGCGGGC
TTTGATTTAACTTGTCTTATACATACATTTGGTATCGATGGGTTTTGAAAACTTAGACTCCGGTGCAGTGT
CAAGAAAGTTAAAGGTCGTTTCATGTAAGAAAGAAATCCGGTGAGTATCTTCTTTTTTATCAACGTACATAATG
CCGTTGGTCTTTACTGATTTAAGCAAACCATCAAATATAGTTAATTTTTGTTTGTGTTGATTATCGTCGGTTTT
TGCACATCAAAACAAAAAGAATTCAGTCAACCCCAACATTGTCATTATTAATGTTTCTGCCTATAAGACTT
ACAGTGTGGTAGCTAATGGAAGGGAAAAACGCAAGACGGTGAGTTGATAGTTTTATCTAAAGATTTAATAAA

AGAAAATGATTTTATCAGAGTTATAAATCATGATGATTATTTAACGTTTCGCGAAAAAATCATAGAGGAATGATG
ATGAGTGACGATGCCTTAGATCTTGATGCTTTGGAGCATAATGAAGAAAAAGCACAAAGAGCTTTTAGAACTGT
ATAAGCATTTTGATTGTGATATTAACGATGTTACATTGCACACTTACTTTAACTTTAAAAATAAAGGTAAAGCGG
GTGCTAAGGACTCTTTAGCTATAAAATTGCCATCCTTAAAAATGACAGTGAGCTAAAACAGTCCATTATTGAT
AATGTGATAAAGAAAACATATCTGATTTAGAAAATCGGGTTGTGATAGTATCAGATGTTAATACACTAAGTGAC
CGCACCAACACCATTTCAATTTTAAATGATGCTGAGCAGTATGATAATGAGCAAATGAAGTTTCTGACTGGCAT
TGTGTTTGTGCTGGGTTTGGTG

● 注意事项

1. 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10；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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。质粒增大一倍，转化效率下降一个数量级。
5. 对于连接产物，最好用膜纯化或乙醇沉淀法纯化 DNA 后用适量 ddH₂O 或 TE 缓冲液重悬产物，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。
6. 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减少最终用于涂板的菌量；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。