

E.coli EcN 1917(T7 RNAP) Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE3045)

E.coli EcN 1917(T7 RNAP) 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

EcN 1917 ΔmalEFG lacUV5::T7RNAP O6:K5:H1 EndA⁺ Dcm⁺

● 产品说明

E.coli EcN 1917(T7 RNAP) 电击感受态细胞只能用于电击转化, 不能用于热激转化。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(T7 RNAP) 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 1917(T7 RNAP) 是在基因组中引入了一个拷贝的 lacUV5 启动子驱动 T7 RNA polymerase/T7 RNAP, 整合到 EcN 的 malEFG 操纵子中, 可以用于各种商业化蛋白表达质粒 (利用 T7 启动子驱动蛋白表达的质粒: pet28a/32a/pGEX/pMAL/pCold 等) 进行蛋白表达, 提高蛋白产量。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 Dcm 甲基化酶; 不可用于蓝、白斑筛选。EcN 1917(T7 RNAP) 感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 > 0.1 × 10⁹ cfu/μg DNA。

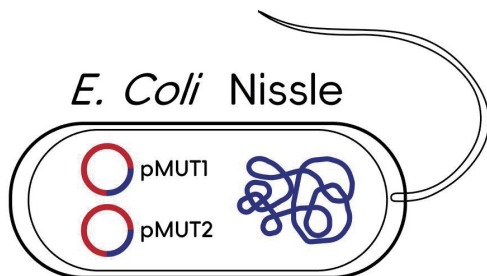
- 注意: 商业化的原核蛋白表达质粒需要加 IPTG 诱导蛋白表达, T7 启动子本身有很强的泄露表达, 不加诱导剂时也会很强的本底表达, 比大部分的组成型启动子更高; 如果需要更高表达量的 T7 质粒, 可选用唯地生物改造的非诱导型 T7 高表达质粒 (货号 CAT#: PE9016/PE9017/PE9018/PE9019/PE9020)

● 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, 待乙醇挥发干净后立即插入冰中, 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 E.coli EcN 1917(T7 RNAP) 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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
CGTGTTGGTATCTCGGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGGTTC
GCCCACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTAACGCCAC
TGGAACCGCCACTGGTAAGCAGGATGTGCGAGAGATGTAACGAGAGTTCTTGAAGTGGCGGCCACTACTG
AGGCTACACTGAAAGGACAGTATTTGGTGACATGTCTCGCACAAGACTGTTACCACGGTTAGAGAATCTGCC
AGGATTAACCTTCGAAAAACACCTGCCAGGGTGGTTTTTTTCTTTTTACAATAGTGAGATTACGACGA
GACTGAATGAATCTCAAGATTTCAATTTAGCCTGCCGCTCGATCATTCAAAGTTTTGAGGTAGCTTCATTGGGT
CATGGTATCCAAGCTCTAAAAGCTTTATATGGTTCGGTGTGACCCGCTGAAATGAATAACCCAGTCAGAAAC
```

CTTGATTCCCATGAAACGTATCTTTAAAAACCGGATCGCCTAAATGAGCATGCCATAATTTGTTAGCTCTAG
CATACTTCTCAATAGCTTCTTTGTTTTCGTAATGATCAGGCACTTCCACGATGGCGATACTTTGCCAGTCCAA
GCTGGATATCCTTTTAAAGGATCGCCAAAGAGATTGTATTTTTCAAATGCTCAATGAAATCATCGATTTTATCG
AGTGTTTTTGCAGAATATCTGGATGTGTAATAAGGTTGAAGGTCTCAGAGAATGAGACAATATTCAATTGTG
GATTTTGC GCGCCTGCTCCGCTGCCATGCTCTTCTGCTCCCGACTTAGACCAGATGGCATTGTAACAGA
CTTCTCATTGCTCTGGAAATCAACAGAGACAAGGATACGCCAAAAACCTCAATATCTTTAACAAGATCATGA
CGTTGTTCCGTTTTTCATATCGCTAACTCCGTATCTAATTCAGGCAGGAAAAATCTTTTCTCGTTTTTCAGAGT
AGTCTTTTTTGGTTGCACAATAATGGCGCCAGTGTACCCTATTCAATGAATATACCATATAATATATACTTTAA
ATATTTGGGGCTTAGGAAAATCAATGACTTACTCCGTTAAGAATAAATGGAAAGCTGGCGGTTTTGTCTCTTG
GCTGGACAGCAGTGCCTACCCTATTGTTTTTATACAAAACGAGAAAAAGCTAACTTCAGTGGCCTTTAACAC
ACTACTTAACCTGATCGTTCACTGGTGGAGTTTGCAAGAGTGGCCGCATCCGTCAATGGAAAGTCTAGCCAT
ACGTATGGGGTTTTCTGTACGGACTGTTGAGAGAGCTATCAATGATCTTGAAAAAGCTAATCTCTTGGACAAG
AAACCAACATCGAAGAGTGATCGCCGATATGGTGGTGCGAATATTTATGATCTAACAAAGCTAGTTGACTACC
TAGATACAATGGGTCCATCAGTAGCTGAACAAGTTAAGAAACCACGCCATAAAAAACCGGTATATACCGTAAG
AAAAACGACAGCTTAAAAAGCACAAATGGAAGTGAAGCGCGAGCGATGCACGATAGCAAAACGATATATTACTT
ATTGCATTGGTCTTGGTAGCCCTGCTTCTGGCTAAACCACTGTCAGGAGTAATTGGCTTTGCCGTGAATGGG
TTCATCGCTTCACAGTTAAAGTTATCGCATAGCTCATATATTTACCATAATCCCTTAATTGTACGCACCACTGAA
ACGCGCTGAACCGGATTCTGACGCAGACACCGCAAAAAGAGATGTTTTACCCCGAAAAACAGGAAGGATG
CGTCAGGATCGTTTTGAGCTCGCTGCATAGCTATGCATGAAAGCGAATGGTGTACTTTGGGAGCTTACGG
TGTTTCATACCGTCAGTTTTCGACAGTTTTCTCTCCGGGAAGCTAATCTGCCATAAGCCTGGATAACAGGGCA
CGGTGATACTCCGTAATAGCGATCAGCACCTCCGCATACTCCCTGTCCCGACACGCTTGCCGTCGATAAAG
AGTTTTTCTGTAACGCCCCAGTCTCATAACTTCTTTGAGTACCCGATCATCAGTCAGTGAGTTAACTTTCTT
ACCGAGAGCTGCCGCCGTAATAAACCGGAAACGGTCTTGCCGCATTGAGCAGCCCTTTTCTGATTTCTT
GGTCTTCTTCTGCCGTGACAGCAACAGGGCGACTGATAGCCCGCTGCGCGTATTACTTCCACTTCGTTTT
GTCATAAACATGGCTCCGTATCTGACATGGGTGTCGGGGCAAAGCCCTGACCAGGGCAATTGTAATAGCGT
GCATGTATGCGCGGTATAACAATTGCACATCCTGTCTGTGAGCAAGCTCGAATTACCGACAAAGGCACGGC
AGTTTTTTGGCAGTGACAGTGTTGTCTGACAGAAATGCCCGTCAAAAAGCCAAGCGGCAGAATAGCGGCAG
CAAAACAGTCGAAAAGTGGTACGCGATATAATCACACAACGCAGATGACAGACAGAACGGAGAAAACGAAA
AGATGAATAAGCAGCAGCAAGCCGTAATCAACATGGCGGGATTCAAAAAAGTCAGAGCCTGACGCTGCTC
GAAAAACTGGACGCACTCAATGCCGACGAACAGGCCGCCATGTGTGAGAACTGCACGAACTCGCAGAAG
AACTCCAGAACAGCATAACAGACACGCTTTGAAGCGGAAAATCTTACCGGGATATAACGCATCCGGACAGGAT
GCAGAACGGCATAGAGGAGCGTAAGGAGAAAATGTCACATAAGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCACTGAC
TCGCTACGCTCGGTCTGACTGCGGCGAGCGGTGTCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCAC
AGAATCGGGGGATAAACCGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGACAAAGACCCAGAAGAAGGGCGCGCGGGA

GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG

● pMUT2 (5514bp) 质粒序列:

GTGATGGCAATGAAAAATATCCCAATTGTTGATTTTGACAGTGTGGATCTAATATCAAAGTTGACTCAATCATT
TTCGTTTTGAGTAAGAATAATGACGACAATTGTATAACCATATACAAGAAGCAATATCCAGTTCAAAACCTTATCA
AGAAAGAAAAATAATTTTTATGGGTTTAGCAAAAAAGAACTATCTCGAGTAGATCAAGATATGATTTCTATTGAT
GGTAAGGCATCTCTGTTTTGCTGGCGATACGGTATTATCTACGACCAAATGTTTTCGAGCGTTTTTTTGG
CTATAAGCATGGATAAAAAATGCTGCCACTGATTTTGTAAACAATATGTCCACTCGTTTTAAGGGATTTGTTG
ACTTAAGCAAATTTATTGAGCGAGTAAATAAGATAGTCATGATGCGGATGCTTTTTCTCGGAAGCTAGCTAAG
GCGTATGCTCGAAGCGAAACAAAGCAAACGCTACAAAACAATAACAAATGAACATCTTAAGAGTGTCTAGATG
AAAATGGATATTTAGCAGGTGTTTTAAAGTATAAAAAAGGTGATGCTACGATTTGCATCGCAAGCCATAACCAG
CAAGATACGTTTATCGCTATGGTATCCGAAGGCGTATTGAGATCGTTGATTACAGGCATTGATTATTAAGCCT
TGGGTCAAAGCGGAAAATATCGTCAGCAGCATCCAATACTACTACCAGTACCACCTCGGATTCTCTTCCGCT
GCCGTGTGAGACAAAACAACCTATATCAGATAACAGCCCTGCTTTTGCGGGGCTTTTTGTTGTGCGTGATG
CGACCTCGATGTACGATAGATGCTGTACTAAGCCAGTACACACAGCGTCCCCTCTTCGAGGTGCCGTCTGT
GACTGTTTCAGGGGGCTCGCCGCCCCCGAAACCCCTTGCATCCACTGCGAAAATTCGCACTTTGGGTGC
GAAACTTTCTCAGCGGATTCTCATGGAAAAGCGCACCAAAGAGATCAAATCAGACTCACCGAAGCGGAGC
ATCAGCGGCTACTTGAACGCTGTGACCGTAAGCATTGGCCGAGTGGTTACGAGCCGTTGGCTTAGGCGAA
TCGCGTACAGCTCGGCGTCTCCGCTACCTACCCTAGACCCGACCTTGTACGTCAGGTCAGCGGGATCG
GTAATAACCTCAATCAATAGCCCGTTACTTGAATCAGCATGGCTTACCGCCGCAAGAACGGGTGTCGTTGTT
AGCGGTGCTCAATAGCATTGACCAACATCTTGCCGAAGTCTGGAGCAACATCGTGATCGTTAAGATTCATG
GTCGTGGTGCCGGTGGCGGGAGTGGTCCTGTCGATTACCTTCTGGGCCCTGATCGTCAGCGCGAACAAGC
GACGGTGTACGGGGTAACCCTGAGCACGTCAAAGAGCTGATTGATGGCTGCGAATTTGCCGAACCTTATA
CCTCTGGCGTGCTCTCTTTTCAGGAGAGTGATTTACCCGAAGGCGAAAAGCAGCGATTGATGGATGAATGG
GAGCAGACATTGATGACCGGTCTAGATAAAGACCAGTATGCCTGCCTCTGGGTTCAACATCAGGACAAAAGG
GCGTCTTGAATTGAATTTTGTATCCCGAACATCGAATTGCAGAGCGGAAAACGGCTACAACCTTACTTTGAT
CGGGCTGACCGGCTCGTGTTAACGCATGGCAAACCCTCACCAATGACCGGCTTGGGTTACGCGACCCGA
ATGACCCTGCTAATCGCCGAGCATTAAACCCCTCTAATGACCTTCTCGCAACAAACAGCAGGCAGCGGAA
GCCATTACCAAAGGGTAATCAGCTTGATTGAGCAGGGAGAAATTACGGATCGTAAAGGGGTGATTTCCAC
CTTACCGATGCCGATTGTGCGTCTGACGGAAACCAAATCCAGTATCAGTATTGCTGATCCGCGAGGTGG
CCCGAATATTCGCTTAAAAGGAGTGCTGTATGAGCGAGATTTAAATTTAGCGCGGGAGTTTCGAGAGCAAAT
CGAAGCAGCAAGCCAAGACTACCGCAACGAGCGTCGCGAACGCATTGAGAAGCACGAGAAACGTATCAC
CGAGGCCTTGAAATTAAGCTCAGGGAACATACAGACCCTATCCAAGAAGAGAACGACAGCCAGCTAAAAC
AGATACACCGCTTAGTCGGAATGACATGGCTGTACAGCCTGGCATTAAAGTGGGATCCTGTTTGGATATTGAT
TGGAGTAGCTTGGTATCTCGGGACTATCGTGGTGAACGCCAGAACGAAATCAGCGAGCAGAGCCAGATCC

TGCAGGACTTAAAGAGCCAGACCGGAGCCGGCGTATCGATAATTCAGATTCCAAGAACAAGAGCGTGTATT
ACCTGATCCTTCCGCAGGGGGCGAAGAAGATCGACGAGTACAAGAACGCTCAACATCGTCAGGTCATCAAG
TACAGCGCCAAATAACCTCATCAGACGCCACAGAATCGATTCTGGGCGTTTTATCTATCAGGGTGAAGAGA
TTCATGACCGAAATGGAGCAGCAGCTTCTGAGCGCATTAGAGAGCTTACAGAGGCACTACGAACAACAGCA
GCAAGCGTGGCAGGACAGCTACGCCAACTTACAGCGCATGTTGAGGTTACCTCGCAGGAGTTGGCGAAA
AACGACAGGGTTTGTGAGGCCTTGAGCATGCAAGTCAACCGGCTTGGCGCAGCAAGTGCAGAGCTTAAACA
GAACAGTGCGCCGCTTGAGCAATTAGCCAAGCGGCACGAACAGCGGTATTCTCGCGGTCACGGCATGAGT
TTATAAGCGTTTATCGGCCGCATCGTAAGCGGCAGAACGCTCGCGCTTACCGACCGCCACCACGAATACCG
TAATGGTTTGATCGCGAACCTGATAGACCAAGCGATAACCGGATGCACGGAGCTTGATTTTGTAGCAGTCAT
GCAGCTCTCGCAGGCGATTTTTATCGATCCGCGGGTGTGTAGAACCTGCTCGAGTTTTTTCTGAACTGCA
GACGGACATCATCCCCGAGCTTGCGCCATTCTTCAGGGCTCGGGGATCAAATCAAGGTTATAGCTCATCC
AGTGACACCTTTACGCCCGCCTGTGGGTTTTCCAGACGATCCCGAACGATAGCCATCAAATCGGCATCATCC
TCGGTCAGCAAAACCTGCTGGAACGGCAAACGTCGCTTGGGCCACATATCCAGTGTGGCGCAGAAC
CTCGGACGGCGTTACGCCAGCTTTTCCAGTGCGGCATAAGAGCGGCTTTTCAGCTCGTCATCGATCCGAA
TATTAATCGTGGCCATCATCTCACCTCTTGATGTAGTGACAAGTGTATCTACAAGAAGTAGTATGAGCGTAAAG
CCGTGCGAGAAACAAGCAGGAATAACGGATTGTGCGGGGATGACAAAAACCGTTGTTGAGGTGTAACCTAGTG
GCAGAAAAACAAGCCCCGAAATCATGCTCTACTTTGGCGAGCGGACATGACATTCAGGGCTAGGTCGAA
ACCTAGAAAGGATATTAGCACATGCAGCGTGCAAAACAACAGCCCCGCCATAAGGCTGGGAGCCTTGATAA
TCAGGCTTTAACGCTTTTTAACGACCGGTTACCCACAAGCCGACTTCTCCGATGATTTACAGTTTGGTGT
CGCATTGCCGGTAAAGAGCGTGCTCTCCTCGCAAAATACATCCAGTTTAAATCAGCCTCACGCCATGTA
CTTTGCTTTGACGTGGACAGAGCCGGAGCCGCGATTGATTGGGCCGATCTGGGGGCACCTGCGCCACAC
TCACCATCAAAAACCCGAGAACGGACATGCTCACCTGTTGTATGCCTTGCATACGGCGGTACGTACCGCG
CCGGATGGTCGAGCTGCCCCCTTAAATACGCCCGCCCATCGAGAATGCGCTGCGTAAAAAATTGGGCGC
AGATGCGGGGTATTCAGGGCTAATTTGCAAGAATCCGAACACCTGCACTGGCAGATCACCGTCTGGCAGC
CAGAGCTCTATACCTTACTGTTAGCCGATTACCTCGACCTTGGCGCAGCCAATGACCGCGAAATCCTG
CCGACTACGGTTTAGGCCGTAACGACCCCTTTCGATAAAACCCGCAAGTGGGCTTACCGCGCTATCCG
CCAAGGCTGGCCGAGTATGACCAATGGCTACAAGCTGCAATTGAACGCGCTAAAGCCTACAACTGCAGT
TCTCCGCACCTTAGACGAGAACGAAGTCATGGGAATTGCTAAAAGTGTGGCTAAGTGGACAAGTAAGAAC
CTTACAGAGCTTGGCTTTGAAGAGTATGTTAAACAACACATACTTCTGAAATTCAGCGTCAACGTGGAAAA
AAAGCTCTGGTGGTGAAGGCCGAAAGTTAGAGATGGAGAATGGATTTCTTTAGGAATAAGTAGATCAACGT
GGTACAGGAAATTTACAAAAATGAAAATTAGAATGTATCTTATCAATGTTGTTTTATTTATACCGATAACAA
TATATTTTTCTGGTATTGATAACGTATGGTCTGTTTTAGATAAGGCCATGTCTTCGTGTTCTGGCGCGGATGGA
AAATTTCAATGCGTACTCGACTATTCAAATAGCAGATTAACATTTTCTGTATTGAGGTGAGTATCGCGGGGC
TTTGATTTAACTTGTCTTATACATACATTTGGTATCGATGGGTTTTGAAAACTTAGACTCCGGTGCGGTGT

CAAGAAAGTTAAAGGTCGTTTCATGTA AAAAAGAATCCGGTGAGTATCTTTCTTTTTATCAACGTACATAATG
CCGTTGGTCTTTACTGATTTAAGCAAACCATCAAATATAGTTAATTTTTGTTTGTTTGATTATCGTCGGTTTTT
TGCACATCAAACAAAAAGAATTCCTGCAACCCAACATTGTCATTATTTAATGTTTCTGCCTATAAGATTACTT
ACAGTGTGGTAGCTAATGGAAGGGAAAAACGCAAGACGGTGAGTTGATAGTTTTATCTAAAGATTTAATAAA
AGAAAATGATTTTATCAGAGTTATAAATCATGATGATTATTTAACGTTTCGCGAAAAAATCATAGAGGAATGATG
ATGAGTGACGATGCCTTAGATCTTGATGCTTTGGAGCATAATGAAGAAAAAGCACAAAGAGCTTTTAGAACTGT
ATAAGCATTTTGATTGTGATATTAACGATGTTACATTGCACACTTACTTTAACTTTAAAAATAAAGGTAAAGCGG
GTGCTAAGGACTCTTTTAGCTATAAAATTGCCATCCTTAAAAATGACAGTGAGCTAAAACAGTCCATTATTGAT
AATGTGATAAAGAAAACCTATATCTGATTTAGAAAATCGGGTTGTGATAGTATCAGATGTTAATACACTAAGTGAC
CGCACCAACACCATTTCAATTTTAAATGATGCTGAGCAGTATGATAATGAGCAAATGAAGTTTCTGACTGGCAT
TGTGTTTGATGCTGGGTTTGGTG

● 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。