

### EcN 1917 recA Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: DL3041)

EcN 1917 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

EcN 1917 recA O6:K5:H1 EndA<sup>+</sup> Dcm<sup>+</sup>

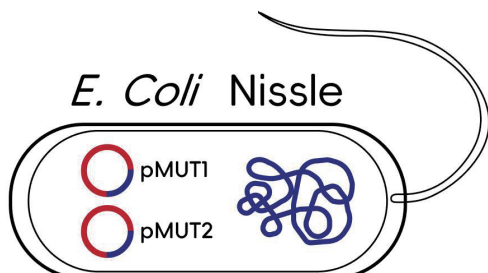
#### ● 产品说明

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 O6: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 recA 菌株来源于 Mutaflo<sup>r</sup> 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 recA 菌株为重组酶缺陷型 (recA), 减少插入片段的同源重组概率, 保证了插入 DNA 的稳定性, 有利于异源蛋白的稳定表达, 提高蛋白表达量; 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 recA 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 > 1 × 10<sup>7</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 操作方法

1. EcN 1917 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°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 μl 不含抗生素的无菌培养基 (2YT 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 100 μl 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°C 培养箱过夜培养。

● 质粒信息



● pMUT1 (3173bp) 质粒序列:

```
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTTGGTATCTCGGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCA GCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTAACGCCAC TGGCAACGGCCACTGGTAAGCAGGATGTGCGAGAGATGTAACGAGAGTTCCTGAAGTGGCGGCTAACTG AGGCTACACTGAAAGGACAGTATTTGGTGACATGTCTCGCACAAAGACTGTTACCACGGTTAGAGAATCTGCC AGGATTAACCTTCGAAAAACACCTGCCAGGGTGGTTTTTTCGTTTTTACAATAGTGAGATTACGACGA GACTGAATGAATCTCAAGATTTCAATAGCCTGCCGCTCGATCATTCAAAGTTTTGAGGTAGCTCATTGGGT CATGGTATCCAAGCTCTAAAAGCTTTATATGGTTCGGTGTGAGCCGCTGGAAATGAATAACCCAGTCAGAAAC CTTGTATTTCCCATGAAACGTATCTTTAAAACCGGATCGCCTAAATGAGCATGCCATAATTTGTTAGCTCTAG CATACTTCTCAATAGCTTCTTTGTTTTCGTAATGATCAGGCACCTTCCACGATGGCGATACTTTGCCAGTCCAA GCTGGATATCCTTTAAAGGATCGCCAAAGAGATTGATTTTTCAAATGCTCAATGAAATCATCGATTTTATCG AGTGTTTTTGCAGAATATCTGGATGTGTAATAAAGGTTGAAGGTCTCAGAGAATGAGACAATATTCAATTGTG GATTTTGCAGCGCTGCTCCGCTGCCATGCTTCTCTGCTCCCGACTTAGACCAGATGGCATTGTAACAGA CTTCTCATTGCTCTGAAATCAACAGAGACAAGGATACGCCAAAACCTCAATATCTTTAACAAGATCATGA CGTTGTTCCGTTTTTCATATCGCTAACTCCGTATCTAATTCAGGCAGGAAAAATCTTTTCTCGTTTTTCAGAGT AGTCTTTTTGGTTGCACAATAATGGCGCCAGTGTACCCTATTCATATGAATATACCATATAATATATACTTTAA ATATTTGGGGCTTAGGAAAATCAATGACTTACTCCGTTAAGAATAAATGGAAAGCTGGCGGTTTTGTCTCTTG GCTGGACAGCAGTGCCTACCGTATTGTTTTTATACAAAACGAGAAAAAGCTAACTTCAGTGGCCTTTAACAC ACTACTTAACCTGATCGTTCCTGTTGGAGTTTGAAGAGTGGCCGCATCCGTCAATGGAAAGTCTAGCCAT ACGTATGGGGGTTTCTGTACGGACTGTTCCAGAGAGCTATCAATGATCTTGAAAAAGCTAATCTCTTGGACAAG AAACCAACATCGAAGAGTGATCGCCGATATGGTGGTCGCAATATTTATGATCTAACAAAGCTAGTTGACTACC TAGATACAATGGGTCCATCAGTAGCTGAACAAGTTAAGAAACCACGCCATAAAAAACCGGTATATACCGTAAG AAAACGACAGCTTAAAAAGCACAATGGAAGTGAAGCGGAGCGATGCACGATAGCAAAACGATATATTACTT ATTGCATTGGTCTTGGTAGCCCTGCTTCTGGCTAAACCACTGTCAGGAGTAATTGGCTTTCCTGTAATGGG
```

TTCATCGCTTCACAGTTAAAGTTATCGCATAGCTCATATATTACCATAATCCCTTAATTGTACGCACCACTGAA  
ACGCGCTGAACGCGATTCTGACGCAGACACCGCAAAAAGAGATGTTTTACCCCGGAAAAACAGGAAGGATG  
CGTCAGGATCGTTTTAGCTCGCTGCATAGCTATGCATGAAAGCGAATGGTGTACTTTGGGAGCTTACGG  
TGTTTCATACCGTCAGTTTTCGACAGTTTTCTCTCCGGGAAGCTAATCTGCCATAAGCCTGGATAACAGGGCA  
CGGTGATACTCCGTAATAGCGATCAGCACCTCCGCATACTCCCTGTCCCCGACACGCTTGCCGTCGATAAAG  
AGTTTTTTCTGTAACGCCCCAGTCTCATAACTTCTTTTCAGTACCCGATCATCAGTCAGTGAGTTAACTTTCTT  
ACCGAGAGCTGCCGCCGTAAAAAACCGGAAACGGTCTTGCCGCATTGACGAGCCCTTTTTCTGATTTCTT  
GGTCTTCTTCTGCCGTCAGACGAACAGGGCGACTGATAGCCCGCTGCGCGTATTACTTCCACTTCGTTTT  
GTCATAAACATGGCTCCGTATCTGACATGGGTGTCGGGGCAAAGCCCTGACCAGGGCAATTGTAATAGCGT  
GCATGTATGCGCGGTATAACAATTGCACATCCTGTCTGTCAGCAAGCTCGAATTACCGACAAAGGCACGGC  
AGTTTTTTGGCAGTGACAGTGTTGTCTGACAGAAATGCCCGTCAAAAAGCCAAGCGGCAGAATAGCGGCAG  
CAAAACAGTCGAAAAGTGGTACGCGATATAATCACACAACGCAGATGACAGACAGAACGGAGAAAACGAAA  
AGATGAATAAGCAGCAGCAAGCCGTAACAATGGCGGGATTGATAAAAAGTCAGAGCCTGACGCTGCTC  
GAAAAACTGGACGCACTCAATGCCGACGAACAGGCCGCCATGTGTGAGAACTGCACGAACTCGCAGAAG  
AACTCCAGAACAGCATACAGACACGCTTTGAAGCGGAAAATCTTACCGGGATATAACGCATCCGGACAGGAT  
GCAGAACGGCATAGAGGAGCGTAAGGAGAAAATGTCACATAAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGAC  
TCGCTACGCTCGGTGCTTGGACTGCGGCGAGCGGTGTCAGCTCAAAAGCGGTAATACGGTTATCCAC  
AGAATCGGGGATAAAACCGGAAAAGAACATGTGAGCAAAAAGACAAAGACCCAGAAGAAGGGCGCGCGGGA  
GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG

● pMUT2 (5514bp) 质粒序列:

GTGATGGCAATGAAAATATCCCAATTGTTGATTTGACAGTGTGGATCTAATATCAAAAAGTTGACTCAATCATT  
TTCGTTTTGAGTAAGAATAATGACGACAATTGTATAACCATATACAAGAAGCAATATCCAGTTCAAAACCTATCA  
AGAAAAGAAAATAATTTTTATGGGTTTAGCAAAAAGAACTATCTCGAGTAGATCAAGATATGATTTCTATTGAT  
GGTAAGGCATCTCTGTTTTGCTGGCGATACGGTATTATCTACGACCAAAATGTTTTCGAGCGTTTTTTGG  
CTATAAAGCATGATAAAAATGCTGCCACTGATTTGTTAACAATATGTCCACTCGTTTTAAGGGATTTGTTG  
ACTTAAGCAAATTTATTGAGCGAGTAAATAAAGATAGTCATGATGCGGATGCTTTTTCTCGGAAGCTAGCTAAG  
GCGTATGCTCGAAGCGAAACAAAGCAAACGCTACAAAACAATAACAAATGAACATCTTAAGAGTGTTCTAGATG  
AAAATGGATATTTAGCAGGTGTTTTAAAGTATAAAAAGGTGATGCTACGATTTGCATCGCAAGCCATAACCAG  
CAAGATACGTTTATCGCTATGGTATCCGAAGCGTATTGAGATCGTTGATTACAGGCATTGATTATTAAGCCT  
TGGGTCAAAGCGGAAAATATCGTCAGCAGCATCCAATACTACTACCAGTACCACTTCGGATTCTCTTCCGCT  
GCCGTGTGAGACAAAACAACCTATATCAGATAACAGCCCTGCTTTTTGCGGGGCTTTTTGTTGTGCGTGATG  
CGACCTCGATGTACGATAGATGCTGTACTAAGCCAGTACACACAGCGTCCCCTCTTCGAGGTGCCGTCTGT  
GACTGTTTCAGGGGCTCGCCGCCCCCGAAAACCCCTTGATCCACTGCGAAAATTCGCACTTTGGGTGC  
GAAACTTTCTCAGCGATTCTCATGAAAAGCGCACCAAGAGATCAAATCAGACTCACCGAAGCGGAGC

ATCAGCGCTACTTGAACGCTGTGACCGTAAGCATTGGCCGAGTGGTTACGAGCCGTTGGCTTAGGCGAA  
TCGCGTACAGCTCGGCGTCGTCGCTACCTACCGTAGACCCGACCTTGTTACGTCAGGTCAGCGGGATCG  
GTAATAACCTCAATCAAATAGCCCGTACTTGAATCAGCATGGCTTACCGCCGCAAGAACGGGTGTCGTTGTT  
AGCGGTGCTCAATAGCATTGACCAACATCTTGCCGAAGTCTGGAGCAACATCGTGATCGTTAAGATTCATG  
GTCGTGGTGCCGGTGGCGGGAGTGGTCCTGTCGATTACCTTCTGGGCCCTGATCGTCAGCGCGAACAAGC  
GACGGTGTTACGGGGTAACCCTGAGCACGTCAAAGAGCTGATTGATGGCTGCGAATTTGCCCGAACTTATA  
CCTCTGGCGTGCTCTCTTTTCAGGAGAGTGATTTACCCGAAGGCCGAAAAGCAGCGATTGATGGATGAATGG  
GAGCAGACATTGATGACCGGTCTAGATAAAGACCAGTATGCCTGCCTCTGGGTTCAACATCAGGACAAAAGG  
GCGTCTTGAATTGAATTTTGTATCCCGAACATCGAATTGCAGAGCGGAAAACGGCTACAACCTTACTTTGAT  
CGGGCTGACCGCCTCGTGTTAACGCATGGCAAACCCTACCAATGACCGGCTTGGGTTACGCGACCCGA  
ATGACCCTGCTAATCGCCGAGCATTAAACCCCTCTAATGACCTTCTCGCAACAAACAGCAGGCAGCGGAA  
GCCATTACCAAAGGGCTAATCAGCTTGATTGAGCAGGGAGAAATTACGGATCGTAAAGGGGTGATTTCCAC  
CTTACCGATGCCGATTGTGCGTGTACGGGAAACCAAATCCAGTATCAGTATTGCTGATCCGGCAGGTGG  
CCCGAATATTCGCTTAAAAGGAGTGCTGTATGAGCGAGATTTAAATTTAGCGCGGGAGTTTCGAGAGCAAAT  
CGAAGCAGCAAGCCAAGACTACCGCAACGAGCGTCGCGAACGCATTGAGAAGCACGAGAAACGTATCAC  
CGAGGCCCTTGAATTAAGCTCAGGGAACATACAGACCGCTATCCAAGAAGAGAACGACAGCCAGCTAAAAC  
AGATACACCGCTTAGTCGGAATGACATGGCTGTACAGCCTGGCATTAGTGGGATCCTGTTTGCGATATTGAT  
TGGAGTAGCTTGGTATCTCGGGACTATCGTGGTGAACGCCAGAACGAAATCAGCGAGCAGAGCCAGATCC  
TGCAGGACTTAAAGAGCCAGACCGGAGCCGGCGTATCGATAATTCACGATTCCAAGAACAAGAGCGTGTATT  
ACCTGATCCTTCCGAGGGGGCGAAGAAGATCGACGAGTACAAGAACGCTCAACATCGTCAGGTCATCAAG  
TACAGCGCAAATAACCTCATCAGACGCCACAGAATCGATTCTGGGCGGTTTTATCTATCAGGGTGAAGAGA  
TTCATGACCGAAATGGAGCAGCAGCTTCTGAGCGCATTAGAGAGCTTACAGAGGCACTACGAACAACAGCA  
GCAAGCGTGGCAGGACAGCTACGCCAACTTACAGCGCATGTTTCGAGGTTACCTCGCAGGAGTTGGCGAAA  
AACGACAGGGTTTTGTCAGGCCTTGAAGCATGCAAGTACCGGCTTGGCGCAGCAAGTCGAGAGCTTAAACA  
GAACAGTGCGCCGCTTGAAGCAATTAGCCAAGCGGCACGAACAGCGGTATTCTCGCGGTCACGGCATGAGT  
TTATAAGCGTTTTATCGGCCGCATCGTAAGCGGCAGAACGCTCGCGCTTACCGACCGCCACCACGAATACCG  
TAATGGTTTTGATCGCGAACCTGATAGACCAAGCGATAACCGGATGCACGGAGCTTGATTTTGTAGCAGTCAT  
GCAGCTCTCGCAGGCGATTTTTATCGATCCGCGGGTGTGTAGAACCTGCTCGAGTTTTTTCTTGAAGTGA  
GACGGACATCATCCCCGAGCTTGCGCCATTCCTCAGGGCTCGGGGATCAAATCAAGGTTATAGCTCATCC  
AGTGACACCTTTACGCCCGCCTGTGGGTTTTCCAGACGATCCCGAACGATAGCCATCAAATCGGCATCATCC  
TCGGTCAGCAAAACCTGCTGGAACGGCAAACGTCGCTTTGGGCCACATATTCCAGTGTGGCGCAGAAC  
CTCGGACGGCGTTACGCCAGCTTTTCCAGTGCGGCATAAGAGCGGCTTTTTCAGCTCGTCATCGATCCGAA  
TATTAATCGTGGCCATCATCTCACCTCTTGATGTAGTGACAAGTGTATCTACAAGAAGTAGTATGAGCGTAAAG  
CCGTGCGAGAACAAGCAGGAATAACGGATTGTGCGGGATGACAAAAACCGTTGTTGAGGTGTAACCTAGTG

GCAGAAAAACAAAGCCCCGAAATCATGCTCTACTTTGGCGAGCGGACATGACATTCAGGGCTAGGTCGAA  
ACCTAGAAAGGATATTAGCACATGCAGCGTGCAAACAACAGCCCCGCCATAAGGCTGGGAGCCTTGATAA  
TCAGGCTTTAACGCTTTTTAACGACCGGTTACCCACAAGCCGTACTTCTCCGATGATTTACAGTTTGGTGT  
CGCATTGCCGTAAGAGCGTGCTCTCCTCGCAAATACATCCAGTTTAAATCAGCCTCACGCCATGTAAGTGG  
CTTTGCTTTGACGTGGACAGAGCCGGAGCCGCGATTGATTGGGCGGATCTGGGGGCACCTGCGCCACAC  
TCACCATCAAAAACCCCGAGAACCGGACATGCTCACCTGTTGTATGCCTTGACATACGGCGGTACGTACCGCG  
CCGGATGGTCGAGCTGCCCCCTTAAATACGCCGCCCATCGAGAATGCGCTGCGTAAAAAATTGGGCGC  
AGATGCGGGGTATTACAGGGCTAATTTGCAAGAATCCGAACCCTGCACTGGCAGATCACCGTCTGGCAGC  
CAGAGCTCTATACCTTACTGGTTAGCCGATTACCTCGACCTTGGCGCAGCCAATGACCGCGAAATCCTG  
CCGACTACGGTTTAGCCGTAAGTGCACCTCTTCGATAAAACCCGCAAGTGGGCTTACCGCGCTATCCG  
CCAAGGCTGGCCGAGTATGACCAATGGCTACAAGCTGCATTGAACGCGCTAAAGCCTACAACCTGCAGT  
TCTCCGCACCTTTAGACGAGAACGAAGTCATGGGAATTGCTAAAAGTGTGGCTAAGTGGACAAGTAAGAAC  
CTTACAGAGCTTGGCTTTGAAGAGTATGTTAAACAAACACATACTTCTGAAATTCAGCGTCAACGTGGAAAA  
AAAGCTCTGGTGGTGAAGGCCGAAAGTTAGAGATGGAGAATGGATTTCTTTAGGAATAAGTAGATCAACGT  
GGTACAGGAAATTTACAAAAATGAAAATTAGAATGTATCTCTTATCAATGTTGTTTTATTATACCGATAACAA  
TATATTTTCTGGTATTGATAACGTATGGTCTGTTTAGATAAGGCCATGTCTTCGTGTTCTGGCGCGGATGGA  
AAATTTCAATGCGTACTCGACTATTCAAATAGCAGATTAACATTTTCTGTATTGAGGTGAGTATCTGCGGGC  
TTTGATTTAACTTGTCTTATACATACATTTGGTATCGATGGGTTTTGAAAACTTAGACTCCGGTGCAGTGT  
CAAGAAAGTTAAAGGTCGTTTCATGTAAGAAAGAAATCCGGTGAGTATCTTTCTTTTATCAACGTACATAATG  
CCGTTGGTCTTACTGATTTAAGCAAACCATCAAATATAGTTAATTTTTGTTTGTGTTGATTATCGTCGGTTTT  
TGCACATCAAAACAAAAGAATTCAGTCAACCAACATTGTCATTATTAATGTTTCTGCCTATAAGACTACTT  
ACAGTGTGGTAGCTAATGGAAGGGAAAAACGCAAGACGGTGAGTTGATAGTTTTATCTAAAGATTTAATAAA  
AGAAAATGATTTTATCAGAGTTATAAATCATGATGATTATTAACGTTTCGCGAAAAAATCATAGAGGAATGATG  
ATGAGTGACGATGCCTTAGATCTTGATGCTTTGGAGCATAATGAAGAAAAAGCACAAGAGCTTTAGAAGTGT  
ATAAGCATTTTGATTGTGATATTAACGATGTTACATTGCACACTTACTTTAACTTTAAAAATAAAGGTAAGCGG  
GTGCTAAGGACTCTTTAGCTATAAAATTGCCATCCTTAAAAATGACAGTGAGCTAAAACAGTCCATTATTGAT  
AATGTGATAAAGAAAATATATCTGATTTAGAAAATCGGGTTGTGATAGTATCAGATGTTAATACACTAAGTGAC  
CGCACCAACACCATTTTCAATTTAAATGATGCTGAGCAGTATGATAATGAGCAAATGAAGTTTCTGACTGGCAT  
TGTGTTGATGCTGGGTTGGTG

### ● 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）。