

### GT115 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: DE1090)

GT115 Electroporation-Competent Cell	50 $\mu$ 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 mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1  $\Delta$ dcm uidA(DMLul)::pir-116 $\Delta$ sbcC-sbcD*

#### ● 产品说明

GT115 菌株, 是专门用来克隆含有发夹结构 (Hairpin) 或重复序列等 DNA 二级结构的基因序列的大肠杆菌菌株。大肠杆菌中存在一种 SbcCD 蛋白复合体, 可以识别 DNA 发夹结构, 并将其切除; 将 sbcC 和 sbcD 两个基因突变, 增强了发夹结构 DNA 的稳定性。同时在大肠杆菌基因组中引入 uidA(DMLul)::pir-116, 使 GT115 可以表达 兀 蛋白, 含有 R6Kg ori 复制子的质粒 (pCpG-mcs、pCpG-LacZ、pCpG-siRNA ...) 可以正常复制。rpsL 赋予 GT115 链霉素抗性, 同时该菌株还含有核酸酶 (endA) 突变、重组酶 (recA) 突变, 增强了外源 DNA 的稳定性。唯地生物生产的 GT115 电击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  $\times$  10<sup>10</sup> cfu/ $\mu$ 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 GT115 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  $\mu$ l 10 pg/ $\mu$ 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/ $\mu$ l, 体积不超过 5  $\mu$ l/50  $\mu$ 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, ddH<sub>2</sub>O 溶解后电击转化。
4. 用 200  $\mu$ 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  $\mu$ F, PC=200  $\Omega$ , 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。

- 5000 rpm 离心一分钟收菌，重悬后取 100-200  $\mu$ 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。
- 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）

### ● 培养基配方：

S.O.C 培养基（唯地 CAT#: CM1014L）PH 7.0	TB 培养基（唯地 CAT#: CM1018L）PH 7.2
2% Tryptone	1.2% Tryptone
0.5% Yeast Extract	2.4% Yeast Extract
10 mM NaCl	0.4% 甘油
2.5 mM KCl	0.231% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM MgCl <sub>2</sub>	1.254% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
10 mM MgSO <sub>4</sub>	TB 培养基中添加 0.017M 磷酸二氢钾和
20 mM glucose	0.072M 磷酸氢二钾成分，在大肠杆菌进入
S.O.C. is suitable for use in the final step of cell transformation to obtain maximal transformation efficiency (Hanahan, 1983).	稳定后期可以稳定培养基 pH 值，提高菌体密度。

### ● 注意事项

- 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。
- 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。
- 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。
- 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提取质粒。质粒增大一倍，转化效率下降一个数量级。
- 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 ddH<sub>2</sub>O 或 TE 缓冲液 (10 mM Tris HCl, pH7.5; 1 mM EDTA) 重悬产物，保证 DNA 浓度不超过 100 ng/ $\mu$ l。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。
- 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相应减少最终用于涂板的菌量。
- 电击感受态细胞最好保存在 -80°C 以下，高于 -80°C 超期储存会导致转化效率会下降。