

MG1655 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE2030)

MG1655 Electroporation-Competent Cell	50μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80℃ (6 个月)

● 基因型

K12 F- *lambda*- *ilvG*- *rfb*-50 *rph*-1

● 产品说明

MG1655 电击感受态细胞只能用于电击转化, 不能用于热激转化。MG1655 菌株来源于 W1485, 是 K12 的衍生菌株, 是一种经过较少改造, 比较接近于“WT-野生型”的大肠杆菌工程菌株。MG1655 外观形态标准, 可作为扩增大肠杆菌 WT 型基因的模板使用, 也可作为蛋白表达的宿主菌株使用, 但不含核酸酶 *endA1* 突变, 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, 以防提取的质粒被降解。MG1655 基因组中的 *LacZ* 基因为野生型, 不能做蓝白斑筛选试验。MG1655 电击感受态细胞适用于大质粒(BAC、cosmid 等)的构建或者各种文库构建, 经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 $>1.5 \times 10^{10}$ cfu/μg 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℃保存的 MG1655 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 μl 10 pg/μl 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/μl, 体积不超过 5 μl/50 μl 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 μl 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 μF, 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℃, 225 rpm 复苏 60 分钟。

- 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℃ 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 ₂ PO ₄
10 mM MgCl ₂	1.254% K ₂ HPO ₄
10 mM MgSO ₄	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 ddH₂O 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/ μ 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℃ 以下, 高于 -80℃ 超期储存会导致转化效率下降。