

E.coli nissle 1917 (Δ pMUT1 Δ pMUT2) Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE3043)

E.coli nissle 1917 (Δ pMUT1 Δ pMUT2) Electroporation-Competent Cell	50 μ l / 支
pUC19 (control vector, 10pg/ μ l)	10 μ l
保存条件 (保质期):	-80°C (6 个月)

● 基因型

E.coli nissle 1917 (Δ pMUT1 Δ pMUT2) O6:K5:H1 EndA⁺ Dcm⁺ Δ pMUT1 Δ pMUT2

● 产品说明

E.coli nissle 1917 (Δ pMUT1 Δ pMUT2) 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 型夹膜具有血清敏感性, 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 (Δ pMUT1/ Δ pMUT2) 菌株是不含两个野生型辅助质粒 pMUT1、pMUT2 的菌株, 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, 唯地生物利用毒性基因替代法将这两个质粒敲除, 获得 EcN 1917 (Δ pMUT1/ Δ pMUT2) 菌株, 去除 pMut1 和 pMut2 可以减轻细胞的代谢负担, 提高外源蛋白表达量, 常用作动物体内试验 (激活 T 细胞、肿瘤治疗、靶向释放蛋白、抗动脉粥样硬化等试验)。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。E. coli nissle 1917 (Δ pMUT1 Δ pMUT2) 感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 $>0.4 \times 10^{10}$ 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°C 保存的 E.coli nissle 1917 (Δ pMUT1 Δ pMUT2) 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/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。
 6. 5000 rpm 离心一分钟收菌，重悬后取 100-200 μl 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。
 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)

● 无质粒 Ecn 1917(ΔpMUT1/ΔpMUT2) 的优点

1. 遗传稳定性和操作简便性：消除内源质粒不兼容风险，pMut1 和 pMut2 有自己的复制子。当引入新的外源质粒时，可能会发生复制子不兼容，导致外源质粒无法稳定维持或被“排挤”掉。无质粒菌株完全消除了这一风险，极大地提高了外源质粒的转化效率和稳定性。
2. 减少基因工具间的相互干扰：pMut1 和 pMut2 上携带的基因(如编码细菌素、调控蛋白等)可能会与引入的基因发生不可预测的交叉干扰。例如，它们可能表达某些调控蛋白，影响外源启动子的活性。无质粒菌株提供了一个“干净”的遗传背景。
3. 减少代谢负担，优化细胞性能：维持和复制质粒需要消耗宿主细胞的能量和资源。去除 pMut1 和 pMut2 可以减轻细胞的代谢负担，提高外源蛋白表达量，这对于治疗性蛋白至关重要，通常能带来更高的生长速率和蛋白产量。
4. 增强生物安全性和环境可控性：防止基因水平转移，pMut1 和 pMut2 有可能转移到环境中的其他细菌(包括肠道内的益生菌、病原菌等)中。无质粒菌株从根本上切断了基因转移的途径，生物安全性更高。

● 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。