

ClearColi K12 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE2040)

ClearColi K12 Electroporation-Competent Cell	50 μ l /支
pUC19 (control vector, 10pg/ μ l)	10 μ l
恢复培养基	50ml
保存条件:	-80 $^{\circ}$ C

● 基因型

F⁻ λ Δ endA⁻ Δ recA⁻ *frs181* *msbA52* Δ gutQ Δ kdsD Δ pxL Δ pxM Δ pagP Δ pxP Δ eptA

● 产品说明

ClearColi K12 电击感受态细胞只能用于电击转化, 不能用于热激转化。ClearColi K12 菌株来源于 K12 *endA*-*recA*-菌株。在 K12 *endA*-*recA*-菌株中引入突变, 导致 ClearColi K12 细胞壁外层的脂多糖 (LPS) 被修饰:LPS 的低聚糖链被删除, 同时 LPS 的两个酰基链也被删除, 进而破坏了 ClearColi K12 大肠杆菌的内毒素信号通路, 使得从该细胞中提取的蛋白或质粒 DNA 中的内毒素含量极低, 提取的无内毒素质粒广泛应用于后续的哺乳动物细胞转化。ClearColi K12 同时缺失核酸内切酶 (*endA*)和重组酶 (*recA*), 提高了质粒 DNA 的产量和质量。唯地生物开发的 ClearColi K12 电击感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒检测转化效率可达 1×10^7 cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

- 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, 待其沥干水分, 正置 5 分钟, 待乙醇挥发干净立即插入冰中, 压实冰面, 电极杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。
- 取 -80 $^{\circ}$ C 保存的 ClearColi K12 电击感受态细胞插入冰中 5 分钟, 待其融化, 加入目的 DNA, 并用手拨打 EP 管底轻轻混匀, 避免产生气泡, 立即插入冰中。
 - 测定转化效率使用 1 μ l 10 pg/ μ l 的对照质粒 pUC19;
 - 对于未知来源或组分不明的质粒 DNA, 请用乙醇沉淀 DNA 后加入适量 TE 缓冲液 (10 mM Tris HCl, pH7.5; 1 mM EDTA)重悬, DNA 浓度不超过 100 ng/ μ l, 体积不超过 5 μ l/50 μ l 感受态。
- 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, 盖上杯盖。
- 启动电转仪, 设置参数: C=25 μ F, PC=200 Ω , V=1.8 kV (此为 BioRad 电转仪推荐参数, 也可按所用电转仪推荐的参数操作), 将电击杯快速放入电转槽中, 电击完成快速插入冰中。
- 2 分钟后从冰中取出电击杯, 放室温, 加入 1ml 不含抗生素的无菌恢复培养基 (室温), 用 1ml 枪吹吸电击杯底部数次混匀后, 转移到 50 ml 离心管 (BD Falcon 50 ml 锥形离心管等), 向离心管中补加恢复培养基 (室温) 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 μ l 涂布到含相应抗生素的 LB (务必使用高盐培养基平板, 不可用 2YT, SOB, SOC 等低盐培养基) 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 培养箱中培养 36-48 小时 (培养 24 小时后可看到很小的克隆)。

LB 培养基 1L(PH:7.0):

Yeast Extract	5g
NaCl	10g
Tryptone	10g

● 注意事项

1. 因 ClearColi K12 细胞壁外层的脂多糖 (LPS) 被修饰, 细胞易死亡, 不易保存, 平板菌在 4 度存放时间应不超过 1 周。且适合在高盐培养基中生长。
2. ClearColi K12 电击感受态效率很低, 不适用于构建质粒使用, 一般用来扩繁质粒, 提取高质量的无内毒素的质粒; 若构建质粒, 请选用 DH5a、TOP10 等转化效率较高的感受态细胞。
3. ClearColi K12 菌株生长缓慢, 平板在 37 度培养时间在 36-48 小时之间。
4. 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 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。
9. 对于连接产物转化, 最好转化前乙醇沉淀 DNA 后用适量 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/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。
10. ClearColi K12 菌株的细胞壁被修饰过, 细胞比较脆弱, 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用于涂板的菌量。
11. 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会下降。