

Stb13 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DL1046)

| | |
|---------------------------------|-------------|
| Stb13 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

F- *mcrB mrr hsdS20*(_{rB}, _{mB}) *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20* (Str^R) *xyl-5 λ⁺leu mtl-1 endA1⁺*

● 产品说明

Stb13 菌株来源于 HB101 *E. coli* strain, 是慢病毒载体系统推荐使用的菌株。基因组含有重组酶 *recA13* 突变, 可有效抑制长片段末端重复区的重组, 降低错误重组的概率; 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对质粒的污染。此菌株具有链霉素抗性, 不存在 *lac^RZΔM15*, 不可用于蓝、白斑筛选。Stb13 感受态细胞经特殊工艺制作, pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 >10⁸ cfu/µg DNA。

● 操作方法

1. Stb13 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 DNA (质粒或连接产物) 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, 迅速放回冰中并静置 2 分钟, 晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 0.9 mL 室温 S.O.C. 或 LB 培养基(S.O.C. 营养丰富, 可提高转化效率)。
4. 37°C, 225 rpm 复苏 60 分钟或 30°C, 225 rpm 复苏 90 分钟。

当质粒中含有不稳定片段时, 30°C 培养可降低错误重组的概率, 若转化 control pUC19 计算转化效率, 则需 37°C, 225 rpm 复苏 60 分钟

5. 5000 rpm 离心 1 分钟收菌, 留取 100 µl 左右上清吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 S.O.C. 或 LB 培养基上。
6. 将平板倒置放于 37°C 或 30°C 培养箱过夜培养。

当质粒中含有不稳定片段时, 30°C 培养可降低错误重组的概率, 若转化 control pUC19 计算转化效率, 则需 37°C 培养过夜

● 注意事项

1. 对不稳定 DNA 片段的克隆或逆转录病毒/慢病毒载体的构建, 涂板后应在 30°C 培养, 以减少发生错误重组的概率。
2. 制备高纯度病毒质粒时, 应使用新鲜转化的平板接菌, 新鲜菌液提取质粒, 菌液不可低温保存后使用。
3. 对不稳定的克隆或病毒质粒优先以质粒状态保存, 尽量避免将质粒保存在大肠杆菌细胞中。
4. S.O.C. 或 LB 培养基均可使用, S.O.C. 可提高转化效率 20%; 实验人员可选择在 37°C 或 30°C 培养细胞, 37°C 条件下, 菌生长速度加快, 有利于提高质粒产量, 30°C 培养可降低错误重组概率。若要获得大量, 高纯度质粒, 建议在 TB 培养基 (唯地 CAT#: CM1018L) 中培养 (以标准质粒 PUC19 为例: 在 TB 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)。
5. 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。转化高浓度的质粒或高效率的连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。

● Stb13 菌株使用常见问题

1. 在使用 Stb13 感受态时怎样提高病毒质粒的产量?

答: Stb13 菌株基因组中核酸内切酶 A1 基因 (endA1+) 为野生型, 没有被突变。在质粒提取过程中, 微量的 endA1 与质粒一起被提取, 导致质粒降解。为了提高 Stb13 菌株中的病毒质粒产量, 可采用以下方法:

- A, 使用商业化的高纯度质粒提取试剂盒 (推荐: QIAGEN #12362 EndoFree Plasmid Maxi Kit)。如使用其他公司产品, 务必使用去蛋白液去除细胞内核酸酶对质粒的污染。
- B, 使用质粒提取溶液 I, II, III 提取质粒时, 确保溶液 I 中含有 10mM 的 EDTA (EDTA 可使 endA1 失活), 并且用酚/氯仿/异戊醇溶液多抽提几次, 尽量去除残留的 endA1。
- C, 接菌时用新鲜的菌斑, 不要使用 4°C 保存的菌落接菌, 摇菌时用大体积容器, 300 rpm, 增加溶氧量。
例如: 小提质粒时, 50 ml 离心管中接入 6 ml LB 菌液, 羧苄青霉素 50 µg/ml, 接新鲜克隆, 37°C, 300rpm 摇菌 20 小时;
大提质粒时, 2L 离心瓶中接入 200ml LB 菌液, 羧苄青霉素 50 µg/ml, 接新鲜克隆, 37°C, 300 rpm 摇菌 20 小时。
- D, 对不稳定的克隆或病毒质粒优先以质粒状态保存, 尽量避免将质粒保存在大肠杆菌细胞中。对摇好的菌液应立即提取质粒, 不可将菌液在室温或低温放置一段时间后提取质粒。
- E, 用 Stable 菌株代替 Stb13 扩繁病毒质粒, Stable 菌株与 Stb13 相比, 基因组含有 endA 突变, 提取的质粒中无核酸内切酶污染, 提高了病毒质粒的产量和纯度, 同时具有 Stb13 菌株的优点, 可降低病毒质粒错误重组的概率。

2. 可以用 TOP10 或 DH5α 代替 Stb13 或 Stable 扩繁病毒质粒吗?

答: 可以代替, Stb13 菌株和 Stable 菌株在病毒构建和扩繁过程中具有很低的错误重组概率, 我们推荐在试验中优先使用。普通大肠杆菌如 TOP10 或 DH5α 也可以扩繁病毒质粒, 只是产量要低一些, 并且在扩繁过程中容易产生错误重组, 导致一些必要元件的删除, 当使用 TOP10 或 DH5α 时, 最好在 30°C 摇菌, 采用低盐浓度的 LB 溶液 (5 g/L 氯化钠) 以降低错误重组的概率。

3. 在使用 Stb13 或 TOP10 感受态细胞构建或扩繁病毒质粒时, 经常会看到在平板上长出偏小或偏大的克隆, 我应该选择哪种克隆进行后续实验?

答: 我们推荐挑选直径偏小的克隆进行后续实验, Stb13 和 TOP10 菌株在构建或扩繁病毒质粒过程中都有可能产生末端重复区的错误重组 (Stb13 菌株错误重组率约为 30%; TOP10 菌株错误重组率约为 70%), 发生错误重组的病毒质粒赋予该克隆生长速度加快的优势, 因而产生直径偏大的克隆。

4. Stb13 平板过夜培养菌落很小, 并且小摇时摇菌很长时间菌液依然很淡, 这种情况怎么解决?

答: 这是正常结果, 与 DH5α 或 TOP10 这种常用克隆菌株相比, Stb13 生长速度确实很慢, 所以平板在 37 度时需要 15-18h, 在 30 度需要 24h。Stable 菌株对融氧要求较高, 小摇时应增大液面面积与液面高度的比值, 这样才能在摇菌时使液面产生起伏波动, 增加融氧, 加快菌株生长。

● 备注

1X SOC 培养基(PH:7.0):

- 2% Tryptone/ Peptone
- 0.5% Yeast Extract
- 10 mM NaCl.
- 2.5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM Glucose

Stb13 感受态中抗生素使用浓度

| 抗生素 | 配制方法 | 工作浓度 |
|-------|------------------|-------------|
| 羧苄青霉素 | 水溶解, 0.22 µm 过滤 | 50 µg/ml |
| 氨苄青霉素 | 水溶解, 0.22 µm 过滤 | 100 µg/ml |
| 氯霉素 | 乙醇溶解, 0.22 µm 过滤 | 34 µg/ml |
| 卡那霉素 | 水溶解, 0.22 µm 过滤 | 30-50 µg/ml |