

### Stb14 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: DE1047)

Stb14 Electroporation-Competent Cell	50µl /支
pUC19 (control vector, 10pg/µl)	10µl
保存条件 (保质期):	-80°C (6个月)

#### ● 基因型

*F' proAB+ lacI<sub>q</sub>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 gyrA96 gal- thi-1 supE44 λ relA1Δ(lac-proAB)*

#### ● 产品说明

Stb14 菌株来源于 Stb12 *E. coli* strain, 可用于慢病毒载体或逆转录病毒载体的构建。Stb14 菌株适合克隆不稳定插入片段 (正向重复序列, 逆转录病毒序列等); *mcrA* 突变和 *mcrBC-hsdRMS-mrr* deletion 使该菌株更适于克隆甲基化的基因组序列。*recA1* 和 *endA1* 的突变有利于克隆 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。*lacI<sup>q</sup>ZΔM15* 标记使得 Stb14 菌株可用于蓝、白斑筛选, 此菌株具有四环素抗性。唯地生物生产的 Stb14 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  $>0.5 \times 10^{10}$  cfu/µg DNA, 特别适合慢病毒质粒文库或逆转录质粒文库的构建。

#### ● 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, 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 Stb14 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, ddH<sub>2</sub>O 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, 盖上杯盖。
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。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

- 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 LB 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 17-20 小时或 30°C 培养箱过夜培养 20-24 小时。若转化 control pUC19 计算转化效率，则需 37°C 培养过夜。
- 若要获得大量，高纯度质粒，建议在 TB 培养基（唯地 CAT#: CM1018L）中 30 度/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

- Stbl4 电击感受只能电击转化，不可用热激方法转化。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。