

BJ5183-AD-1 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DE1076)

BJ5183-AD-1 Electroporation-Competent Cell	50 μ l /支
pCAMBIA2301 (control vector, 10ng/ μ l)	10 μ l
保存条件 (保质期):	-80 $^{\circ}$ C (6个月)

● 基因型

endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str^R) [pAdEasy-1 (Amp^R)]

● 产品说明

BJ5183-AD-1 是携带了腺病毒质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 菌株。BJ5183 菌株是一种具有较高重组活力的大肠杆菌菌株，是目前腺病毒系统最常用的感受态细胞。BJ5183 菌株含有 *sbcBC recBC* 双重突变，赋予 BJ5183 细胞较强的重组能力，有利于转入的目的基因与腺病毒骨架质粒的重组。*endA1* (缺失核酸内切酶) 的突变有利于重组 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。BJ5183-AD-1 菌株细胞中已经提前转入了腺病毒质粒 pAdEasy-1[encodes the Adenovirus-5 genome (E1/E3 deleted)], 赋予该菌株氨苄抗性，在病毒质粒构建时，只需转入线性化的目的质粒即可，简化了实验步骤，提高了病毒质粒重组概率。*Str^r* 赋予 BJ5183-AD-1 菌株链霉素抗性。BJ5183-AD-1 电击感受态细胞适用于普通质粒和大质粒的构建，经特殊工艺制作，pCAMBIA2301 (12739bp, Kan^R) 检测转化效率 >1 \times 10⁶ 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 以便盖上杯盖，冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取 -80 $^{\circ}$ C 保存的 BJ5183-AD-1 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/ μ l，体积不超过 5 μ l/50 μ l 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 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)，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 μ F, 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 $^{\circ}$ C, 225 rpm 复苏 60 分钟。

6. 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 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养 13-17 小时。

● S.O.C 培养基（唯地 CAT#: CM1014L）配方：

- 2% Tryptone
- 0.5% Yeast Extract
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM glucose
- PH-7.0

S.O.C. Medium is suitable for use in the final step of cell transformation to obtain maximal transformation efficiency of E. coli (Hanahan, 1983).

● 注意事项

1. 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 电击感受态细胞最好保存在-80 $^{\circ}$ C以下，高于-80 $^{\circ}$ C超期储存会导致转化效率会下降。