

### EPI300 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: DE1084)

EPI300 Electroporation-Competent Cell	50 $\mu$ l /支
pUC19 (control vector, 10pg/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
保存条件 (保质期):	-80 $^{\circ}$ C (6个月)

#### ● 基因型

F – *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara,leu*)7697 *galU* *galK*  $\lambda$  – *rpsL* *nupG* *trfA* *dhfr*.

#### ● 产品说明

EPI300 电击感受态细胞只能用于电击转化, 不能用于热激转化。EPI300 细胞含有一个突变的 *trfA* 基因, 该基因表达出的蛋白产物可以促进含有 *ori V* 复制子的质粒的高拷贝扩繁, 诱导剂 I 可以诱导 *trfA* 基因的表达。当含有 *ori V* 复制子质粒的 EPI300 细胞在 LB/2YT 或 SOB 培养基中生长时, *trfA* 基因的表达被抑制, *ori V* 复制子质粒的拷贝数维持在很低的水平; 当在培养基中加入诱导剂 I, *ori V* 复制子质粒的拷贝数可维持在很高的水平, 提高了质粒产量。因此 EPI300 菌株可以降低 *ori V* 复制子质粒的拷贝数, 特别适合于各种不稳定 DNA 或毒性基因的克隆。[*mcrA*, $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)]基因型使 EPI300 菌株适合于克隆富含甲基胞嘧啶或甲基腺嘌呤的 DNA (例如: 哺乳动物基因组 DNA)。 *recA1* 和 *endA1* 的突变有利于插入 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。 *lacZ* $\Delta$ M15 标记的存在使 EPI300 可用于蓝白斑筛选, *rpsL* 赋予其链霉素抗性。此外, EPI300 电击感受态细胞转化效率极高, 特别适用于文库构建, 唯地生物生产的 EPI300 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 >1  $\times$  10<sup>10</sup> cfu/ $\mu$ 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 $^{\circ}$ C 保存的 EPI300 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  $\mu$ l 10 pg/ $\mu$ 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/ $\mu$ l, 体积不超过 5  $\mu$ l/50  $\mu$ 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, ddH<sub>2</sub>O 溶解后电击转化。
4. 用 200  $\mu$ 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  $\mu$ F, PC=200  $\Omega$ , 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  $\mu$ 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°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 MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM MgSO<sub>4</sub>
- 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 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。
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°C以下，高于-80°C超期储存会导致转化效率会下降。