

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 (保质期):	-80 $^{\circ}$ C (6个月)

● 基因型

F⁻ λ Δ endA Δ recA *frt181* *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 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 $>1 \times 10^7$ cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

1. 取适量 LB 放 37 度预热 1-2 小时 (每管感受态准备 10ml LB)。
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 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 (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 LB (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 LB 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 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°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（唯地 CAT#: CM1010L）配方(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，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。
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°C 以下，高于 -80°C 超期储存会导致转化效率会下降。